

**Primärpräventive Effekte von Weizenaleuron  
in humanen Kolonzellen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von  
Dipl. troph. Katrin Stein  
geboren am 03.10.1981 in Jena

### **Gutachter**

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Glei, Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerald Rimbach, Kiel
3. Gutachter: Prof. Dr. Siegfried Knasmüller, Wien

**Tag der öffentlichen Disputation: 22.05.2012**

In Erinnerung an  
meine Mutti

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>1</b>
1.1 Der Dickdarm.....	1
1.2 Entstehung von Dickdarmkrebs .....	3
1.2.1 Bedeutung des Kolorektalkarzinoms .....	3
1.2.2 Molekulare Mechanismen der Kolonkarzinogenese.....	4
1.3 Chemoprävention .....	6
1.3.1 Ansatzpunkte zur Krebsprävention.....	6
1.3.2 Biotransformation .....	8
1.3.2.1 Glutathion-S-Transferasen .....	9
1.3.2.2 Sulfotransferasen.....	10
1.3.3 Antioxidative Abwehr.....	11
1.3.3.1 Oxidativer Stress .....	11
1.3.3.2 Katalase .....	12
1.3.4 Ballaststoffe .....	13
1.3.5 Präbiotika .....	15
1.3.6 Probiotika.....	17
1.3.7 Synbiotika .....	18
1.4 Weizen.....	19
1.4.1 Aufbau des Weizenkorns .....	20
1.4.2 Zusammensetzung und Gewinnung der Aleuronfraktion .....	21
1.4.3 Chemopräventive Eigenschaften von Weizen .....	21
1.5 <i>In vitro</i> Fermentationsmodelle .....	23
<b>2 Zielstellung .....</b>	<b>26</b>
<b>3 Publikationen .....</b>	<b>27</b>
3.1 Publikation I: Modification of an <i>in vitro</i> model simulating the whole digestive process to investigate cellular endpoints of chemoprevention. ....	27
3.2 Publikation II: Fermented wheat aleurone induces enzymes involved in detoxification of carcinogens and in antioxidative defence in human colon cells. ....	38

3.3 Publikation III: Effects of synbiotic fermentation products on primary chemoprevention in human colon cells. ....	50
<b>4 Weitere Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
4.1 Charakterisierung der Fermentationsüberstände und –pellets nach erfolgter <i>in vitro</i> Fermentation .....	59
4.1.1 In vitro Fermentation I .....	60
4.1.1.1 Fermentationsüberstände.....	60
4.1.1.2 Fermentationspellets .....	61
4.1.2 In vitro Fermentation II.....	62
4.1.2.1 Fermentationsüberstände.....	63
4.1.2.2 Fermentationspellets .....	64
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>66</b>
5.1 <i>In vitro</i> Fermentation.....	66
5.1.1 Etablierung eines neuen in vitro Models zur Simulation des gesamten Gastrointestinaltrakts (GIT).....	66
5.1.2 Metabolite in den FÜ des fermentierten Aleurons.....	69
5.1.3 Einfluss von Probiotika LGG® /Bb12 und Clostridium butyricum auf die Bildung verschiedener Fermentationsmetabolite .....	70
5.2 Effekte des FÜ von fermentiertem Aleuron in humanen Kolonozyten (Fermentation I).....	73
5.2.1 Modulation der Genexpression in humanen Kolonzellen.....	73
5.2.2 Modulation der Enzymaktivitäten der GST und Katalase in humanen Kolonzellen.....	77
5.2.3 Schutz gegenüber oxidativem Stress – antigenotoxische Eigenschaften in Kolonzellen.....	79
5.3 Effekte der FÜ von fermentiertem Aleuron mit/ohne Zugabe der Probiotika LGG®/Bb12 in humanen Kolonozyten (Fermentation II) .....	80
5.3.1 Modulation der Genexpression in humanen Kolonozyten .....	80
5.3.2 Modulation der Enzymaktivitäten in humanen Kolonozyten .....	82
5.3.3 Schutz gegenüber oxidativem Stress – antigenotoxische Eigenschaften in humanen Kolonozyten.....	83
5.4 Einfluss der Fermentation von Aleuron mit/ohne Zugabe der Probiotika LGG®/Bb12 auf die Bakterienzusammensetzung im Fermentations-pellet.....	85

5.4.1	Fermentation I.....	85
5.4.2	Fermentation II .....	87
5.5	Zusammenfassende Schlussfolgerungen.....	90
5.6	Ausblick .....	92
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>XXII</b>
	<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>XXIII</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>XXVII</b>
	<b>Eigenständigkeitserklärung .....</b>	<b>XXVIII</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b> Verteilung wichtiger Vertreter der Mikrobiota (KbE, Koloniebildende Einheiten; modifiziert nach (4-6).....	1
<b>Abb. 2</b> Genetisches Modell der kolorektalen Karzinogenese nach Fearon und Vogelstein (24). ....	5
<b>Abb. 3</b> Chemopräventive Ansatzpunkte (Primär-, Sekundär- und Tertiärprävention) innerhalb der Krebsentstehung. Dabei kann über verschiedene Mechanismen der Prozess der Initiation vermieden und die Transformation bereits entarteter Zellen (Promotion/Progression) gehemmt werden (ROS, reaktive Sauerstoffspezies). Modifiziert nach (40-42). ....	7
<b>Abb. 4</b> Das Phasenmodell des Fremdstoffmetabolismus und dabei involvierte Enzyme (modifiziert nach (47, 48). Der Fremdstoffmetabolismus vollzieht sich in drei aufeinanderfolgenden Phasen (Phase I, II und III), in denen die Wasserlöslichkeit des Substrates erhöht und damit die Ausscheidung ermöglicht wird. CYP, Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen; FMO, Flavin-abhängige Monooxygenasen; MAO, Monoaminoxidasen; COX, Cyclooxygenasen; ADH, Alkoholdehydrogenase; ALDH, Aldehyddehydrogenase; GST, Glutathion-S-Transferasen; UGT, UDP-Glucuronosyltransferasen; SULT, Sulfotransferasen; NAT, N-Acetyltransferasen; MT, Methyltransferasen. ....	9
<b>Abb. 5</b> Aufbau des Weizenkorns (KAMPFFMEYER Food Innovation GmbH, 2008) .....	20
<b>Abb. 6</b> Nrf2-vermittelte Regulation der Genexpression verschiedener Enzyme (modifiziert nach (213, 216)). ARE, Antioxidant responsive element; GST, Glutathion-S-Transferasen; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; MAF2, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog; NQO1, NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase; Nrf2, Nuclear factor-E2-related factor 2; SULT, Sulfotransferasen; UGT, UDP-Glucuronosyltransferasen. ....	75

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1</b> Physiologische Funktionen der Mikrobiota. Die körpereigenen Bakterien üben eine Mischung aus funktionellen, strukturellen und metabolischen Wirkungen auf die Darmschleimhaut aus. ....	2
<b>Tab. 2</b> Chemische Zusammensetzung von Weizenaleuron (EU,US) .....	60
<b>Tab. 3</b> Charakterisierung der Fermentationsserien .....	60
<b>Tab. 4</b> pH-Wert und Konzentrationen ausgewählter Metabolite in den FÜ nach in vitro Fermentation (n=6). <sup>s</sup> .....	61
<b>Tab. 5</b> Prozentuale Bakterienzusammensetzung in den Fermentationspellets der Fermentation I (n=6). ....	62
<b>Tab. 6</b> Verwendete Fermentationsansätze. ....	63
<b>Tab. 7</b> pH-Wert und Konzentrationen ausgewählter Metabolite in den FÜ nach in vitro Fermentation (n=2). <sup>s</sup> .....	64
<b>Tab. 8</b> Prozentuale Bakterienzusammensetzung in den Fermentationspellets der Fermentation II (n=2). ....	65
<b>Tab. 9</b> Primer und Detektionssysteme für die real-time qPCR.....	XXII
<b>Tab. 10</b> Temperaturprofile für die real-time qPCR .....	XXII



**Abkürzungsverzeichnis**

ABC	ATP-binding cassette
ACF	Abberant Cryp Foci
ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AOM	Azoxymethan
APC	adenomatöse Polyposis Coli
ARE	Antioxidant responsive element
Bb12	Bifidobacterium animalis supsp. lactis
CA	Cholsäure (englisch: cholic acid)
COX	Cyclooxygenasen
CYP	Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen
DCA	Deoxycholsäure (englisch: deoxycholic acid)
DCC	deleted in Colon Carcinoma
DMH	1,2-Dimethylhydrazin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EU	europäisch
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FAM	Flavin-abhängige Monooxygenasen
FÜ	Fermentationsüberstand
GIT	Gastrointestinaltrakt
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferasen
HNE	Hydroxynonenal
IQ	2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinolin
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
k-Ras	kirsten rat sarcoma viral oncogene
KbE	Koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
LGG	Lactobacillus rhamnosus GG
LOH	loss of heterozygosity
MAF2	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
MAO	Monoaminoxidasen

MNNG	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -Nitro- <i>N</i> -Nitrosoguanidin
MT	Methyltransferasen
NAT	N-Acetyltransferasen
NQO1	NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase
Nrf2	Nuclear factor-E2-related factor 2
p53	Tumor protein 53
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (englisch: reactive oxygen species)
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (englisch: short chain fatty acids)
SHIME	simulated human intestinal microbial ecosystem
SOD	Superoxiddismutase
SULT	Sulfotransferasen
TIM	TNO Intestinal Model
TM	Trockenmasse
UGT	UDP-Glucuronosyltransferasen
US	amerikanisch
WCRF	internationale Krebsforschungsorganisation (englisch: World Cancer Research Fund)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (englisch: World Health Organization)

# 1 Theoretische Grundlagen

## 1.1 Der Dickdarm

Der Dickdarm stellt ein hochkomplexes und dynamisches Ökosystem dar und lässt sich funktionell in verschiedene Abschnitte einteilen (Caecum mit Appendix, Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens, Sigma, Rektum und Anus). Er dient der Rückresorption von Wasser und Elektrolyten aus dem Chymus, um den Verlust von Wasser zu vermeiden und das Volumen des Darminhalts zu verkleinern. Darüber hinaus besteht seine Aufgabe in der Resorption von mikrobiell gebildeten Metaboliten, dem Transport, der Speicherung und der geregelten Entleerung der Fäzes.

Der menschliche Verdauungstrakt ist eines der am dichtesten besiedelten Ökosysteme und weist eine Keimvielfalt von 400-500 Spezies auf, wobei sich Schätzungen auf bis zu 1000 Spezies belaufen (1, 2). Hierbei dominieren die Stämme *Firmicutes* und *Bacteroides* (3). Die Zusammensetzung der Mikrobiota des Darms entwickelt sich vom Zeitpunkt der Geburt an stetig weiter und wird maßgeblich durch die Nahrungszufuhr beeinflusst (4). Im Vergleich zum oberen Darmabschnitt weist der Dickdarm die höchste Besiedlungsdichte auf, so dass bei einem Erwachsenen eine Keimdichte von  $10^{10}$ - $10^{12}$  Mikroorganismen/g Darminhalt erreicht wird (Abb. 1) (4). Über 99 % dieser Bakterien sind obligate Anaerobier. Die hier vorkommenden Spezies gehören der Gattungen *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Escherichia*, *Clostridia* und *Lactobacillus* an (2).

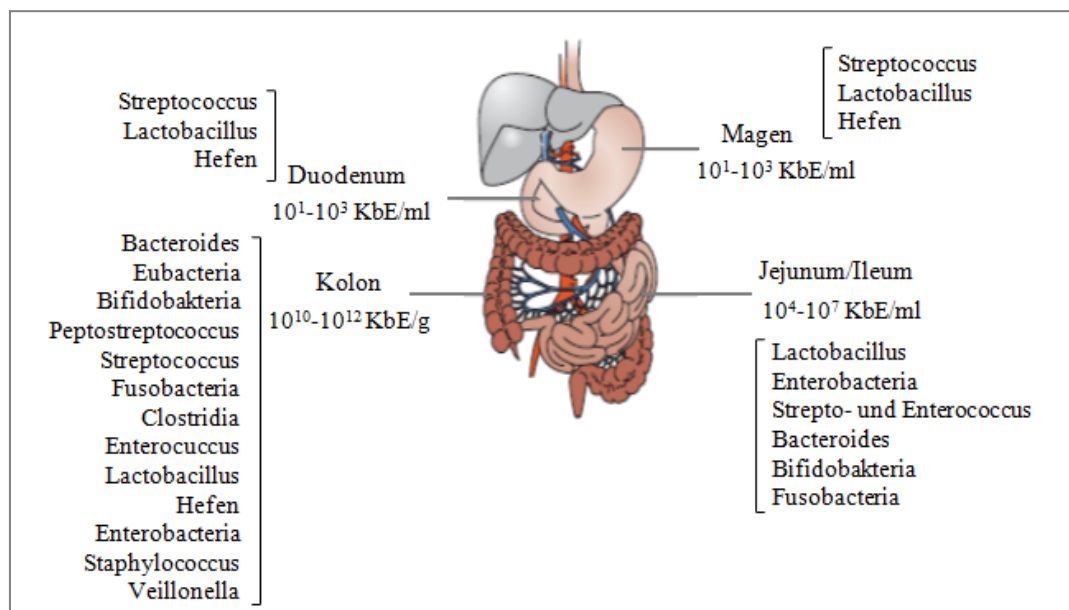


Abb. 1 Verteilung wichtiger Vertreter der Mikrobiota (KbE, Koloniebildende Einheiten; modifiziert nach (4-6).

Die Mikrobiota des Darms leistet einen bedeutenden Beitrag zur Gesundheit des Menschen (Tab. 1). Sie fungiert als erste Barriere gegen die Ansiedlung pathogener Keime und ist ein wichtiger Bestandteil der humanen Abwehr, indem die Entwicklung und Aktivität des Darm-assoziierten Immunsystems positiv beeinflusst wird. Darüber hinaus leistet sie einen besonderen Beitrag zum intraluminalen Stoffwechsel im Dickdarm, indem sie nicht absorbierbare, komplexe Nahrungsbestandteile und endogene Substrate metabolisiert (7).

Tab. 1 Physiologische Funktionen der Mikrobiota. Die körpereigenen Bakterien üben eine Mischung aus funktionellen, strukturellen und metabolischen Wirkungen auf die Darmschleimhaut aus.

Schutzfunktionen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verdrängung pathogener Keime</li> <li>• Bildung antimikrobieller Stoffe (z. B. Milchsäure, Bakteriozine) → Hemmung des Wachstum „negativer“ Bakterien</li> </ul>
Strukturelle Effekte	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Barriere-Funktion</li> <li>• Bildung und Aufrechterhaltung des darmassoziierten Immunsystems</li> <li>• Bildung des enterischen Nervensystems</li> </ul>
Metabolische Effekte	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metabolisierung von Kanzerogenen der Nahrung</li> <li>• Fermentation unverdaulicher Nahrungsbestandteile</li> <li>• Synthese von B-Vitamine, Folsäure und Vitamin K<sub>2</sub></li> <li>• Bildung kurzkettiger Fettsäuren (SCFA)</li> <li>• Positiver Einfluss auf Differenzierung und Proliferation der intestinalen Epithelzellen</li> </ul>

Zu den unverdaulichen Nahrungsbestandteilen zählen neben resistenter Stärke, Nicht-Stärke-Polysaccharide, Oligosaccharide auch unvollständig hydrolysierte Kohlenhydrate, Aminosäure und Proteine (8, 9). Im proximalen Kolon dominieren, aufgrund ihrer Fähigkeit zur saccharolytischen Spaltung, azidophile Bakterienarten, die zur Bildung von gesundheitsfördernden kurzkettigen Fettsäuren (englisch: short-chain fatty acids: SCFA) beitragen. Hingegen kolonisieren im distalen Kolon zusätzlich Bakterien mit proteolytischen Fähigkeiten, so genannte Fäulniskeime, die neben Aminosäuren auch toxische Metabolite wie N-Nitroso-Verbindungen, Ammoniak, Phenole, Amine und Indole freisetzen (10, 11).

Die meisten Bakterien besitzen ein breites Spektrum unterschiedlicher Stoffwechselaktivitäten und innerhalb einer Gattung finden sich Spezies mit abweichenden Eigenschaften (günstige und ungünstige Auswirkungen). Als vorteilhafte Bakterien der Mikrobiota gelten insbesondere *Bifidobacteria* und *Lactobacilli*. Beide Gattungen fermentieren ausschließlich Kohlenhydrate und produzieren Laktat und Azetat als Endprodukte. *Lactobacilli* sind dafür bekannt, die Verdauung der Laktose bei Personen mit Laktoseintoleranz zu unterstützen,

die Darmträgheit und frühkindliche Diarrhoe zu reduzieren sowie das Reizdarmsyndrom zu lindern. Zu den Wirkungen der *Bifidobacteria* zählen unter anderem die Stimulation des Immunsystems, die Produktion von B-Vitaminen, die Verringerung der Ammoniak- und Lipidkonzentration im Blut und die Reduktion des Wachstums pathogener Keime. Letzteres gilt als eine besondere Eigenschaft dieser Gattung und ist vermutlich auf die Bildung der Säuren zurückzuführen. Aufgrund des dadurch entstehenden sauren Milieus zeigen pathogene Keime nur ein begrenztes Wachstum (8, 12).

Demgegenüber stehen Bakterien mit negativen Aktivitäten, welche durch die Gattungen wie *Clostridia*, *Veillonella*, *Proteus* und *Staphylococcus* vertreten werden (13). Diese Bakterien sind in der Lage, Prokanzerogene zu aktivieren, Mutagene zu bilden und inflammatorische Prozesse auszulösen (14). Somit kann davon ausgegangen werden, dass Produkte des bakteriellen Metabolismus Risikofaktoren für Initiation und/oder Progression der Kolonkarzinogenese darstellen können (15).

## 1.2 Entstehung von Dickdarmkrebs

### 1.2.1 Bedeutung des Kolorektalkarzinoms

Maligne Neubildungen stellen neben den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Das Auftreten des Kolorektalkarzinoms nimmt inzwischen die zweithäufigste Krebserkrankung ein. Des Weiteren steht dieses Karzinom an zweiter Stelle der Krebstodesursache in Deutschland. Insgesamt wurden im Jahr 2006 in Deutschland bei 32440 Frauen und 36300 Männern Darmkrebserkrankungen diagnostiziert (16).

Die Entstehung des Kolorektalkarzinoms ist mehrheitlich nicht nur auf eine Ursache zurückzuführen, vielmehr ist das Zusammenspiel mehrerer Faktoren für die Entstehung verantwortlich (16, 17). So beruht nur ein verhältnismäßig geringer Anteil (<10 %) aller Krebsfälle auf einer vererbten genetischen Veränderung, wohingegen 90-95 % der Fälle verschiedenen Lebensstil- und Umweltfaktoren zugeschrieben werden (18). Eine besondere Rolle in der Krebsätiologie kommt ungesunden Ernährungsgewohnheiten zu, welche zu 50 % den größten Beitrag leisten (18, 19). Dabei ist nicht jede Tumorform gleichermaßen von der Ernährung beeinflussbar. Da vor allem die Entwicklung der kolorektalen Karzine zu 70 % durch die Ernährung bedingt ist (18), könnte eine Umstellung der Ernährungsweise wesentlich zu einer Reduktion der Darmkrebsinzidenz beitragen.

### 1.2.2 Molekulare Mechanismen der Kolonkarzinogenese

Die Karzinogenese beschreibt einen dynamischen und meist über viele Jahre andauernden Mehrstufenprozess, der durch die drei wesentlichen Vorgänge Initiation, Promotion und Progression definiert ist. Die Entwicklung von Krebs wird hierbei als Endresultat einer Aufeinanderfolge von sowohl erblich bedingten als auch erworbenen Mutationen angesehen. Damit verbunden sind Änderungen im Verhalten der Zelle, was sich zunächst in einem Verlust der Wachstumskontrolle und letztendlich in einer abnormen Vermehrung der veränderten Zellen äußert (20, 21).

Die Epithelzellen des Kolons kommen zeitlebens mit Kanzerogenen aus der Nahrung und der Umwelt und pathogenen Keimen in Berührung (22), wodurch die Entstehung von Entartungen in den Zellen begünstigt wird. Ausgangspunkt der Krebsentstehung ist das Auftreten von DNA-Schäden in normalen Zellen, die wachstumsregulatorische Gene (Protoonkogene und Tumorsuppressorgene) und/oder DNA-Reparaturgene (Mismatch Reparaturgene) betreffen (23). Werden diese induzierten DNA-Aberrationen nicht durch zelleigene Abwehrmechanismen wie DNA-Reparatur und Apoptose erkannt und beseitigt, kommt es zur Manifestation des Defektes und somit zum Beginn des Verlustes zellwachstumsregulierender Mechanismen (**Initiations**phase). Die Phase der **Promotion** ist durch die selektive Stimulation der Vermehrung initiiertter Zellen durch Tumorpromotoren gekennzeichnet, wodurch die Bildung von präneoplastischen Läsionen begünstigt und damit der Transformationsprozess vorangetrieben wird. Erst die **Progressions**phase beschreibt die Akkumulation weiterer Mutationen, die zu einer zunehmenden Entdifferenzierung der Zellen führen und Tumordinvasion und Metastasenbildung begünstigen (24, 25).

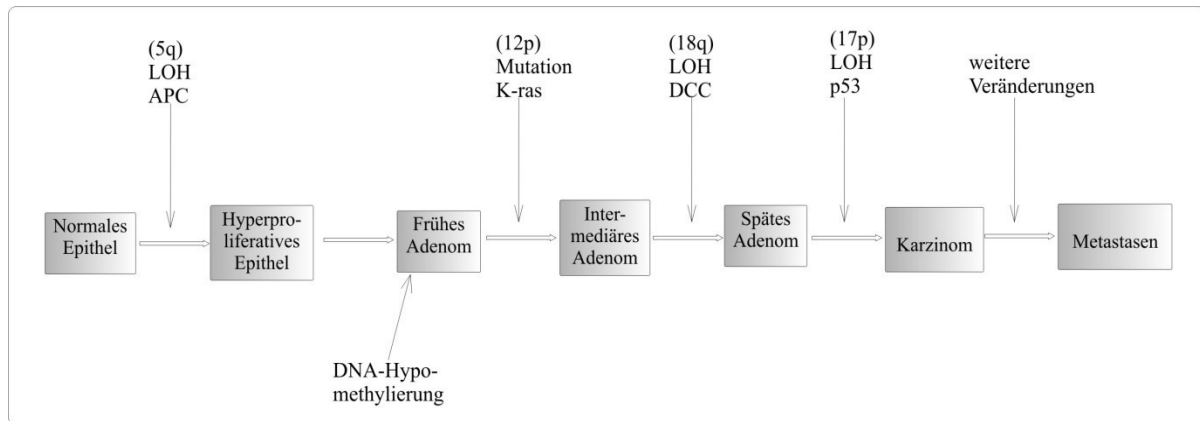


Abb. 2 Genetisches Modell der kolorektalen Karzinogenese nach Fearon und Vogelstein (24).

Fearon und Vogelstein haben bereits 1990 ein genetisches Modell der kolorektalen Karzinogenese entwickelt, in dem die morphologischen Änderungen des normalen Dickdarmepithels in Abhängigkeit der genetischen Veränderung dargestellt sind (Abb. 2) (24).

Das Heranwachsen gesunder Epithelzellen zum Adenokarzinom ist mit zahlreichen genetischen, aber auch epigenetischen sowie histologischen Veränderungen verbunden. Am Prozess der Karzinogenese sind eine Vielzahl von Genen involviert, welche das Tumorsuppressorgene *APC* (*adenomatöse polyposis coli*), *DCC* (*deleted in Colon Carcinoma*) und *p53* (*tumor protein 53*) sowie das Protoonkogen *k-Ras* (*kirsten rat sarcoma viral oncogene*) betreffen (26). Die Entstehung von Dickdarmkrebs ist mit der Aktivierung der Protoonkogene und dem Inaktivieren der Tumorsuppressorgene assoziiert (23). Die morphologischen Stadien der neoplastischen Progression beinhalten die Aberrant Crypt Foci (ACF; Mikroadenome), Adenome und Karzinome, wobei die ACF als früheste neoplastische Läsion in der Kolonkarzinogenese auftreten. Die Mutationen im *APC*-Gen und der Verlust der Heterozygotie (LOH, loss of heterozygosity) in den Stammzellen der Kolonkrypten und damit dessen Inaktivierung stellt oft die erste und häufigste (in 70 % aller adenomatösen Polypen und Karzinomen) molekulare Veränderung dar (23, 26, 27). Aufgrund seiner regulatorischen Eigenschaften innerhalb des Zellwachstums und der Signaltransduktion äußert sich die Mutation in einer zellulären Hyperproliferation des Kolonepithels und einer verringerten Apoptoserate. Personen mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) sind wesentlich häufiger von der Entstehung adenomatöser Polypen betroffen, weil das *APC*-Gen bereits im heterozygoten Zustand existiert, wodurch die Wahrscheinlichkeit für die Inaktivierung des verbleibenden Wildtyp-Allels und somit dessen Funktionsverlust stark ansteigt (23).

*K-Ras* ist an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt. Eine Überaktivierung durch Mutation (50 % aller Karzinome und 50 % aller Adenome > 1cm betroffen) resultiert in einer Verstärkung mitogener Signale, wodurch die Zellproliferation und die weitere Transformation des Adenoms vorangetrieben wird (23, 28). *DCC* repräsentiert ein Transmembranprotein mit Funktion der Zelladhäsion. Die durch Mutation hervorgerufene Senkung der Expression führt zur Veränderung der Zelladhäsion und damit zur Verminderung von wachstumshemmenden Signalen (24). Die Mutation von *p53* tritt häufig nur in der späten Phase der Karzinogenese, die Transition von einem späten Adenom zum Karzinom, auf. Diese Veränderung kann in 75 % aller Karzinome beobachtet werden (24, 29). Als „Wächter des Genoms“ reguliert *p53* Gene, die Bestandteil zahlreicher Regelmechanismen, die v.a. die Zellzykluskontrolle und den programmierten Zelltod betreffen (30, 31). Kommt es zur Inaktivierung des *p53*-Proteins, können geschädigte Zellen ungehindert in die S-Phase des Zellzyklus eintreten, ohne dass Reparatur stattgefunden hat. Darüber hinaus ist das Überleben dieser Zellen weiterhin gegeben, da in Folge des Funktionsausfalls die Apoptose nicht eingeleitet werden kann. Eine Inaktivierung der Funktion des *p53*-Proteins wäre daher mit dem Verlust dieser Regelmechanismen und dadurch mit einer erhöhten Sensibilität des Genoms gegenüber weiteren Mutationen assoziiert.

### 1.3 Chemoprävention

#### 1.3.1 Ansatzpunkte zur Krebsprävention

Die Chemoprävention ist ein Gebiet der Krebsforschung, welche die Krebsprävention durch pharmakologische, biologische und ernährungsabhängige Interventionen fokussiert. Als Chemoprävention definiert man die Verwendung natürlicher oder synthetischer Stoffe, um in die Phasen Initiation oder Progression der Karzinogenese präventiv einzugreifen, diese umzukehren oder aufzuhalten (32, 33). Hierzu existieren drei Ansatzpunkte innerhalb der Chemoprävention – die **Primär-, Sekundär- und Tertiärprävention**.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, um Substanzen mit einem chemopräventiven Potential zu identifizieren (34-37). Nach Wattenberg können diese Verbindungen aufgrund ihrer divergenten Funktionalität hauptsächlich in zwei Kategorien, die *blocking agents* und die *suppressing agents*, eingeteilt werden (38). *Blocking agents* können im Rahmen der Primärprävention (Vermeidung der Krankheitsentstehung) in den Initiationsprozess der Kolonkarzinogenese präventiv eingreifen, so dass die Entstehung einer präneoplastischen Läsion aus einer gesunden nicht transformierten Zelle ver-



hindert wird. Dabei werden verschiedene Mechanismen, die im anschließendem Kapitel aufgeführt werden, diskutiert. Liegt bereits ein präneoplastisches Stadium vor, besteht die Möglichkeit sekundärpräventiv über die *suppressing agents* einzugreifen. Diese inhibieren die Umwandlung und Weiterentwicklung veränderter Zellen in maligne Formen. Dabei greifen sie in die Promotions- und Progressionsphase der Karzinogenese ein (38). Im Rahmen therapeutischer Ansätze (Tertiärprävention) können schließlich charakteristische Eigenschaften stark transformierter Zellen wie das Invasions- und Metastasierungsverhalten blockiert werden (39). Zugrundeliegende Mechanismen der Chemoprävention sind in Abb. 3 zusammengefasst dargestellt.

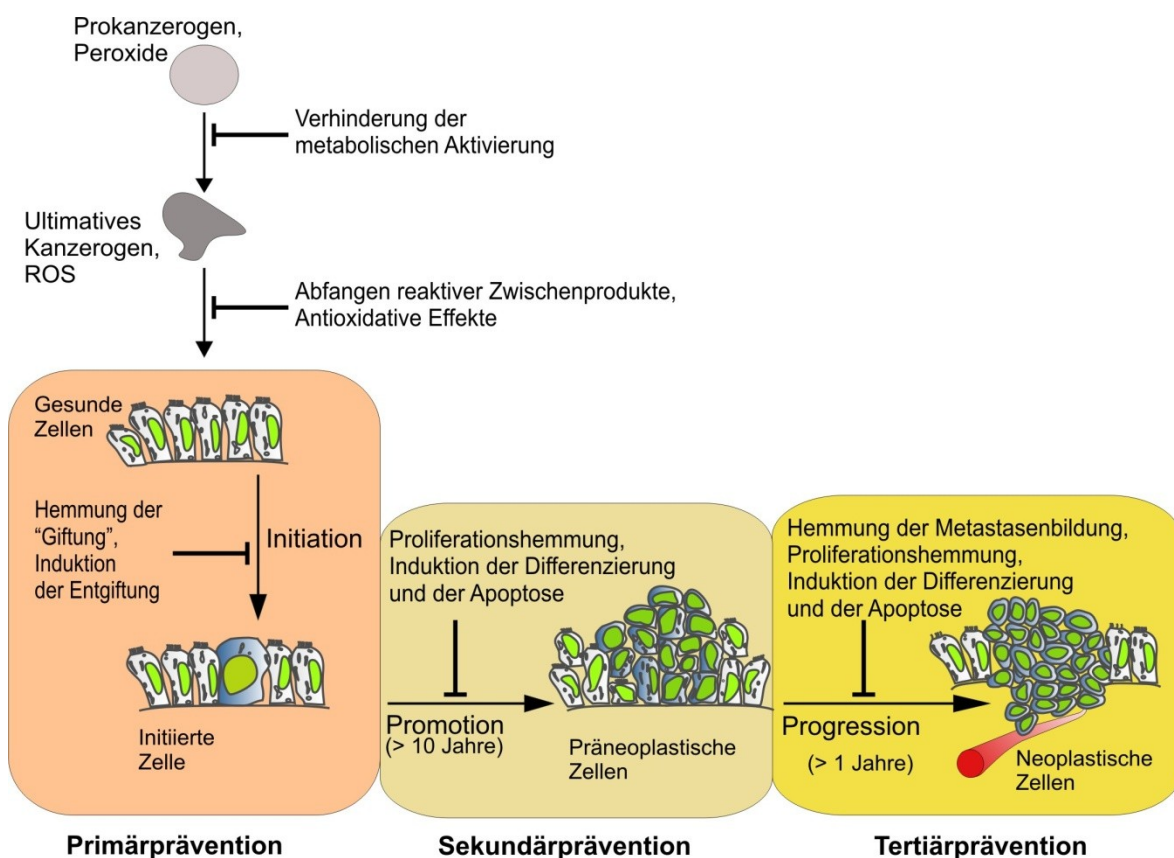


Abb. 3 Chemopräventive Ansatzpunkte (Primär-, Sekundär- und Tertiärprävention) innerhalb der Krebsentstehung. Dabei kann über verschiedene Mechanismen der Prozess der Initiation vermieden und die Transformation bereits entarteter Zellen (Promotion/Progression) gehemmt werden (ROS, reaktive Sauerstoffspezies). Modifiziert nach (40-42).

Der effektivste Weg präventiv in die Karzinogenese einzugreifen, beinhaltet die Hemmung des Initiationsprozesses (Primärprävention) durch die Vermeidung von DNA-Schäden, die durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder Kanzerogenen induziert werden.

So umfasst ein Mechanismus das direkte Abfangen von ROS, bevor sie mit Makromolekülen (z. B. DNA, RNA, Proteine) in der Zelle interagieren können. Ein weiterer Mechanismus beschreibt die Veränderung des Metabolismus von Prokanzerogenen, so dass die metabolische Aktivierung zu Kanzerogenen verhindert oder das Entgiftungssystem induziert wird.

### 1.3.2 Biotransformation

Um eine Akkumulation gesundheitsschädlicher exogener (Xenobiotika, Umwelttoxine) und endogener Stoffe (Stoffwechselprodukte) im menschlichen Organismus zu vermeiden, verfügt der Körper über ein komplexes System von Entgiftungsenzymen, welches eine entscheidende Rolle in dem Metabolismus dieser Substanzen spielt (43). Das Entgiftungssystem zeigt eine hohe individuelle Variabilität und wird stark durch die Umwelt, den Lebensstil und die genetische Ausstattung des Individuums beeinflusst (44). Obwohl Biotransformationsvorgänge vorrangig in der Leber stattfinden, sind metabolische Aktivitäten auch in extra-hepatischen Geweben wie dem Darm nachzuweisen (45).

Die Biotransformation vollzieht sich in drei aufeinanderfolgenden Phasen, in denen die Wasserlöslichkeit des Substrates erhöht und damit die Ausscheidung ermöglicht wird. Die **Phase I** beschreibt die Funktionalisierung lipophiler Substrate, indem eine funktionelle Gruppe durch Oxidations-, Reduktions- und/oder Hydrolysereaktionen in das Fremdstoffmolekül eingeführt oder freigelegt wird. Im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen ist damit oft eine Bildung reaktiver Metabolite verbunden. In Abhängigkeit ihrer Reaktivität sind sie in der Lage, mit Makromolekülen wie Proteine, RNA und DNA zu reagieren, wodurch sie ein zytotoxisches und/oder genotoxisches Potential aufweisen. In einigen wenigen Fällen können anschließend die gebildeten Metabolite direkt ausgeschieden werden (46). Die biologische Aktivität des entstehenden Intermediat wird vorwiegend durch eine Konjugationsreaktion (**Phase II**) mit hydrophilen Gruppen (z. B. Glutathion oder Sulfat) entgiftet. Im Anschluss erfolgt der gerichtete energieabhängige Transport der Metabolite über spezielle Carriersysteme (ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*)) aus der Zelle (**Phase III**) (44). Das Phasenmodell der Biotransformation und die dabei involvierten Enzymsysteme sind in Abb. 4 dargestellt.

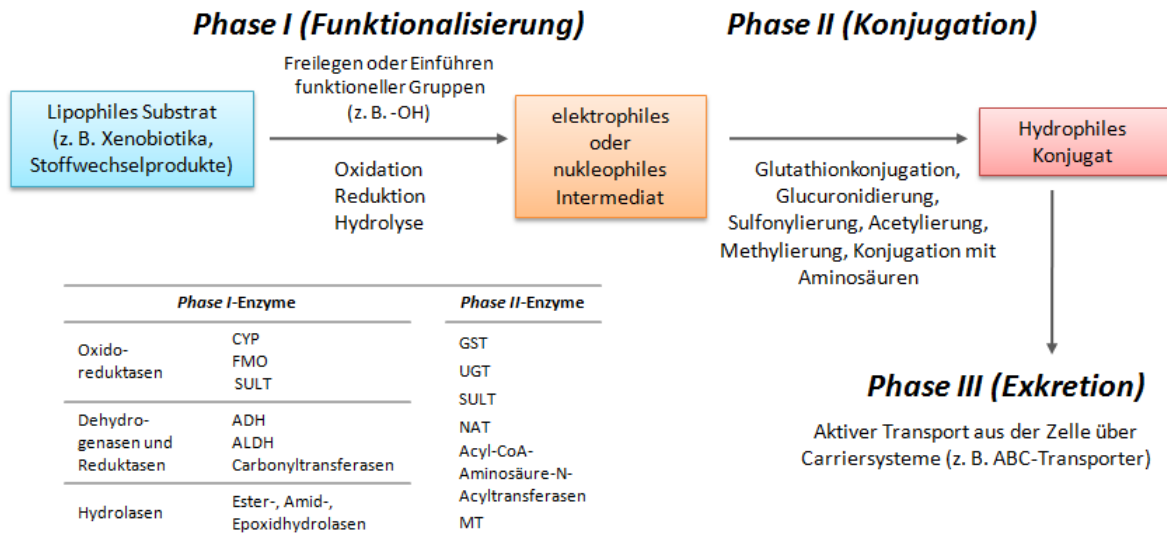


Abb. 4 Das Phasenmodell des Fremdstoffmetabolismus und dabei involvierte Enzyme (modifiziert nach (47, 48)). Der Fremdstoffmetabolismus vollzieht sich in drei aufeinanderfolgenden Phasen (Phase I, II und III), in denen die Wasserlöslichkeit des Substrates erhöht und damit die Ausscheidung ermöglicht wird. CYP, Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen; FMO, Flavin-abhängige Monooxygenasen; MAO, Monoaminoxidasen; COX, Cyclooxygenasen; ADH, Alkoholdehydrogenase; ALDH, Aldehyddehydrogenase; GST, Glutathion-S-Transferasen; UGT, UDP-Glucuronosyltransferasen; SULT, Sulfotransferasen; NAT, N-Acetyltransferasen; MT, Methyltransferasen.

Innerhalb der Primärprävention könnte insbesondere eine Induktion von *Phase II*-Entgiftungsenzymen zu einer Hemmung der Initiation im Prozess der Karzinogenese beitragen. In den folgenden Abschnitten werden zwei Vertreter der *Phase II*-Enzyme herausgestellt.

#### 1.3.2.1 Glutathion-S-Transferasen

Die Glutathion-S-Transferasen (GST) sind eine große Familie von Entgiftungsenzymen, welche die Konjugation von sowohl endogenen als auch exogenen elektrophilen Substraten mit dem Tripeptid Glutathion (GSH:  $\gamma$ -Glutaminsäure, Cystein und Glycin) katalysieren. Die GSH-Konjugation bewirkt eine gesteigerte Wasserlöslichkeit des Metaboliten. Vor ihrer hauptsächlich renalen Ausscheidung aus dem Organismus werden die Konjugate zu Mercaptursäurederivaten abgebaut (49). Einige GST-Isoformen verfügen über Peroxidase-, Isomerase- oder nicht-katalytische Bindungsaktivitäten (50). Es wird postuliert, dass die GST das Krebsrisiko beeinflussen, indem eine erhöhte GST-Aktivität in einer verbesserten Entgiftung von Kanzerogenen resultiert und schließlich zur Krebsprävention beiträgt (51,

52). So konnten Grubben *et al.* eine signifikante, inverse Beziehung zwischen GST-Aktivität und der Inzidenz von Kolonkrebs aufzeigen (53). Neben diesen wichtigen detoxifizierenden Eigenschaften kann eine Überexpression in Krebszellen zu einer Chemoresistenz durch Inaktivierung von therapeutisch eingesetzten Zytostatika führen (54).

Auf Grundlage ihrer strukturellen, physiochemischen und enzymatischen Eigenschaften werden die humanen GST in drei verschiedene Familien (zytosolisch, mitochondrial, mikrosomal) eingeteilt, die sich wiederum in entsprechende Klassen und deren Isoformen untergliedern. Es sind bisher sieben Klassen für die zytosolischen GST (alpha, mu, pi, sigma, theta, omega und zeta) mit insgesamt 16 Isoformen beschrieben, wobei die alpha, mu, pi und theta die Hauptklassen repräsentieren. Die vorhandenen Isoenzyme werden gewebe-, geschlechts-, alters- und speziesspezifisch exprimiert (51, 55) und weisen unterschiedliche Substratspezifitäten auf (56). So besitzt z. B. die GSTP1, als Hauptisoform im Dickdarm (51, 57), welche eine Abnahme ihrer Expression vom Magen hin zum Dickdarm aufweist (58), eine hohe Affinität zu Benzo[a]pyren-Metaboliten und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) (59).

Vergleichend zu anderen Bereichen des Darmes wurde eine niedrigere enzymatische Gesamtaktivität der GST in der Mukosa im Dickdarm mit einer höheren Tumorzinzidenz detektiert. Aber auch für andere Entgiftungsenzyme wird diese Erscheinung beschrieben. Daher wird angenommen, dass die geringe Entgiftungskapazität im Zusammenhang mit der erhöhten Inzidenz für Kolorektalkrebs steht (53, 60). Demzufolge könnte eine Induktion der GST-Gesamtaktivität einen guten Ansatzpunkt zur Prävention von Kolorektalkrebs einnehmen.

### 1.3.2.2 Sulfotransferasen

Sulfotransferasen (SULT) werden in zwei Enzymfamilien unterteilt: zytosolische SULT und membrangebundene SULT. Dabei spielen letztere keine Rolle im *Phase II*-Fremdstoffmetabolismus. Diese mit dem Golgi-Apparat assoziierten Formen sulfonieren Peptide, Proteine, Lipide und Glykosaminoglykane. Dadurch werden diesen Substraten ihre strukturellen und funktionellen Eigenschaften zugewiesen (61). Die zytosolischen, löslichen Enzyme kommen in vielen Geweben wie Leber, Nieren, Gastrointestinaltrakt und Lunge vor (61). Sie katalysieren im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus die Übertragung der Sulfonyl-Gruppe vom Cosubstrat 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) auf

nukleophile Akzeptorsubstrate. Im Menschen werden derzeit 11 verschiedene SULT beschrieben, die in Abhängigkeit ihrer Aminosäuresequenz und Substratspezifität in 3 Subfamilien geteilt werden (62, 63). Die SULT1 (Aryl-Sulfotransferasen) werden in 7 weitere SULT (SULT1A1, SULT1A2, SULT1A3, SULT1B1, SULT1C1, SULT1C2 und SULT1E1) eingeteilt, welche überwiegend Phenole (z. B. Östrogene) und Catechole (z. B. Catecholamine) verstoffwechseln. Demgegenüber steht die SULT2-Familie (Hydroxysteroid-Sulfotransferasen) mit 3 den bekannten Unterfamilien SULT2A1, SULT2B1a und SULT2B1b. Diese sulfonieren vornehmlich Steroide (Schilddrüsen- und Sexualhormone), Sterole und andere Alkohole (Benzylalkohole). Eine exakte Charakterisierung der dritten Subfamilie der SULT konnte bislang nicht erfolgen (63-65). Als wichtige *Phase II*-Enzyme neben den GST könnte eine Modulation ausgewählter SULT zur Krebsprävention beitragen. Neben ihrer positiven Funktion als Entgiftungsenzyme ist für die einzelnen Isoformen SULT1A1, -1A3, -1E1, und -2A1 die Fähigkeit bekannt, die biologische Aktivität diverser Metabolite von Xenobiotika wie PAK und heterozyklischen Amine zu steigern (63).

### 1.3.3 *Antioxidative Abwehr*

#### 1.3.3.1 *Oxidativer Stress*

Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wird die Fähigkeit zugesprochen, neben der Genese zahlreicher Erkrankungen wie z. B. Alzheimer, Diabetes Typ 2 und Arteriosklerose die Karzinogenese, insbesondere über die Schädigung der DNA, zu induzieren (66). Dabei wurde postuliert, dass die daraus resultierenden Mutationen besonders im Prozess der Initiation und Progression der Krebsentstehung von Bedeutung sind (67).

Eine Vielzahl von Verbindungen, welche sich vom molekularen Sauerstoff ableiten, fasst man zur Gruppe der ROS zusammen. Diese sind, im Gegensatz zum molekularen Sauerstoff, durch eine hohe chemische Reaktivität gekennzeichnet und entstehen durch die schrittweise Reduktion des Sauerstoffmoleküls. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Klasse gehören das Superoxidradikalanion ( $O_2^{\cdot-}$ ), das Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxylradikal ( $OH^{\cdot}$ ). Das  $OH^{\cdot}$  wird durch die Metallionen-katalysierte Spaltung von  $H_2O_2$  innerhalb der sogenannten Fenton-Reaktion gebildet, ist stark reaktiv und daher in der Lage, mit Makromolekülen der Zelle zu interagieren (68).

ROS sind ubiquitär in unserer natürlichen Umwelt vertreten. Exogene Quellen für die Bildung von ROS sind u. a. ionisierende Strahlung, UV-Licht, Ozon, Metallionen (Eisen-

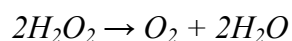
Ionen) und Pharmazeutika (69). Die Produktion von ROS hat auch einen endogenen Ursprung. So werden diese in physiologischen (z. B. Zellmetabolismus, Signaltransduktion) und pathophysiologischen Prozessen (z. B. Immunabwehr) gebildet (70). Letztere stellen die wichtigste endogene Quelle freier Radikale dar. Hierbei bedingen die mit degenerativen Erkrankungen (z. B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen) einhergehenden Entzündungsprozesse eine verstärkte Exposition der Zelle gegenüber ROS, die letztlich zelluläre Schäden zur Folge haben kann (71).

Allen eukaryotischen, funktionstüchtigen Zellen stehen sowohl enzymatische (Katalase, Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase) als auch nicht-enzymatische antioxidative Schutzmechanismen (Vitamin C und E) zur Verfügung. Kommt es jedoch zu einer Imbalance zwischen der Bildung von ROS und dieser antioxidativen Abwehr, resultiert oxidativer Stress, wodurch die zelluläre Homöostase durch eine Induktion oxidativer Schäden in zellulären Makromolekülen wie Lipiden, Proteinen und DNA gestört wird (72, 73).

Die Katalase repräsentiert das Schlüsselenzym des enzymatischen Abwehrsystems, weshalb im folgenden Abschnitt (Kapitel 1.3.3.2) diese kurz vorgestellt wird.

### 1.3.3.2 Katalase

Die Katalase ist eines der Schlüsselenzyme der enzymatischen Abwehr von oxidativem Stress und ist in den Peroxisomen der Zelle lokalisiert (68). Sie katalysiert sehr effizient die Disproportionierung von  $H_2O_2$  zu Sauerstoff und Wasserstoff ( $\sim 10^7$  Moleküle/Sec) (74).



Die Katalase besitzt die höchste katalytische Effizienz der bisher bekannten Enzyme. Ihre Aktivität ist gewebespezifisch. Diese ist in der Leber und den Erythrozyten am höchsten und im Herz und im Gehirn am niedrigsten (74). Sie ist ein Homotetramer mit einer Molekularmasse von 240 kDa, welches vier identische Untereinheiten mit je eine Hämgruppe gebunden hat, die letztlich für den schnellen Abbau von  $H_2O_2$  verantwortlich ist (72, 75). Aufgrund ihrer stabilen Struktur ist sie resistent gegenüber dem pH-Wert, der hitzeabhängigen Denaturierung und der Proteolyse (74). Des Weiteren hat die Katalase auch die Fähigkeit, begrenzt als Peroxidase zu wirken. Beispielsweise katalysiert sie die Reaktion von Alkohol mit  $H_2O_2$  unter der Bildung von Azetaldehyd (75).

Bislang konnten zahlreiche Studien einen Zusammenhang zwischen einer niedrigen Enzymaktivität der Katalase und dem Auftreten verschiedener Erkrankungen (z. B. Diabetes, Arteriosklerose, Krebs) belegen (74). Daher könnten ein hohes Expressionsniveau und eine gesteigerte Enzymaktivität aufgrund des verstärkten Abbaus von  $H_2O_2$  mit einer Reduktion von oxidativen DNA-Schäden einhergehen. Dieser Effekt könnte im Rahmen der Krebsprävention von Bedeutung sein. Welcher Einfluss hierbei von Nahrungsinhaltsstoffen auf eine mögliche Induktion der Katalase ausgeht, war bisher nicht Gegenstand von Untersuchungen.

#### 1.3.4 Ballaststoffe

Bei den Ballaststoffen kann von einer heterogenen Substanzgruppe ausgegangen werden. Sie werden definiert als der essbare Bestandteil von Pflanzen oder entsprechenden Kohlenhydraten ( $\geq 10$  Monomere), welche keinem Verdau und keiner Absorption im Dünndarm unterliegen, aber vollständig oder partiell im Kolon fermentiert werden und verschiedene positive Wirkungen auf den Verdauungstrakt sowie die Gesundheit des Körpers zeigen. Sie beinhalten Nicht-Stärke-Polysaccharide (z. B. Zellulose, Hemizellulose,  $\beta$ -Glucane, Inulin, Arabinoxylane), resistente Stärke, Oligosaccharide, Lignin und weitere pflanzliche Substanzen wie Wachse oder Phytate (76-79).

Burkitt beobachtete bereits 1971 ein höheres Stuhlvolumen in der südafrikanischen Bevölkerung im Vergleich zu den Europäern (80). Diese Beobachtung begründete er mit der ballaststoffreichen Ernährung der Südafrikaner im Vergleich zur ballaststoffarmen und fettreichen Ernährung der Europäer. In diesem Zusammenhang erwähnte er eine niedrigere Dickdarmkrebsrate im Vergleich zur europäischen Bevölkerung. Auch heute noch stehen Ballaststoffe im Fokus zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen, um deren gesundheitliche und mögliche krebopräventive Eigenschaften aufzudecken. Epidemiologische und vorklinische Studien deuten darauf hin, dass ein erhöhter Verzehr an Ballaststoffen die Darmgesundheit fördert (81-83). Doch konnten andere Studien (76, 84) keinen protektiven Schutz der Ballaststoffe gegenüber der Krebsentstehung bestätigen. Gründe für diese Kontroverse sind vielfältig und resultieren möglicherweise aus der begrenzten Aussagekraft epidemiologischer Untersuchungen (85). Auch könnten eine zu geringe Aufnahme ( $< 30$  g Ballaststoffe), die Qualität der verzehrten Faserstoffe (Fermentierbarkeit durch die Darmflora und dadurch Bildung von SCFA) oder die An- bzw. Abwesenheit von weiteren

pflanzlichen Bestandteilen (Phytoprotektanten mit antioxidativem Potenzial) in der Nahrung, Gründe für das Fehlen von gesundheitsfördernden Effekten im Darm sein (86-88).

Ungeachtet dessen empfehlen der WCRF und die WHO überwiegend pflanzliche Lebensmittel in Form von Obst/Gemüse und relativ unverarbeitetes Getreide zu verzehren. Dabei sollten die Lebensmittel, die eine natürliche Ballaststoffquelle darstellen, zu einem Verzehr von mindestens 25 g Ballaststoffen pro Tag beitragen (76, 89).

Ballaststoffe können in Abhängigkeit ihrer physikalischen Eigenschaften über verschiedene Mechanismen das Risiko für die Entstehung des Kolorektalkarzinoms senken. Sie erhöhen das Stuhlvolumen, binden Kanzerogene und Prokanzerogene und reduzieren die Kontaktzeit zwischen Toxinen und der Kolonmukosa durch die Verkürzung der Transitzeit der Fäzes. Zusätzlich führt der Verzehr der Ballaststoffe zur Bindung von primären und sekundären Gallensäuren und zur Bildung von SCFA (Azetat, Propionat, Butyrat), wodurch der pH-Wert im Kolon gesenkt wird. Zudem führen sie zur Erhöhung der Proliferation des Epithels, indem sie indirekt über die Bildung von Butyrat den Kolonzellen als Energiequelle dienen (90).

Als eine der bedeutenden Fermentationsmetabolite werden die zuvor genannten SCFA, insbesondere Azetat, Propionat und Butyrat, beschrieben, welche aus der bakteriellen Fermentation unverdaulicher Nahrungsbestandteile (siehe Kapitel 1.3.4) resultieren (91, 92). Die absoluten Konzentrationen an SCFA variieren in Abhängigkeit von der Ernährung und vom Darmabschnitt. Als physiologische Konzentration werden 70-140 mM im proximalen Kolon und 20-70 mM im distalen Kolon angesehen. Neben der absoluten Konzentration ist auch das prozentuale Verhältnis der SCFA für die physiologischen Funktionen und Effekte entscheidend. Populationsanalysen zeigten die Bildung der SCFA in der Reihenfolge Azetat > Propionat  $\geq$  Butyrat mit einem Verhältnis von 60:20:20 bis 60:25:15 (91). Vor allem die chemopräventiven Wirkungen von Butyrat erlangten in den vergangenen Jahren zunehmend Interesse. Zum einen fördert Butyrat das Wachstum gesunder Kolonozyten, denen es als Energiequelle dient (93-95). Zum anderen zeigten *in vitro* Untersuchungen, dass in Tumorzellen durch Butyrat die Zellproliferation gehemmt wird und die Apoptose und Differenzierung induziert werden (96-98). Diese Gegensätze werden als das **Butyrat-Paradoxon** bezeichnet (99). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Butyrat *Phase II*-Entgiftungsenzyme, z. B. GST, induziert und damit die Entgiftungskapazität der Zellen stärkt (100).



Mit der Bildung der gesundheitsfördernden SCFA ist die pH-Wert-Erniedrigung verbunden. Die Senkung des pH-Wertes ist hinsichtlich der Karzinogenese von Dickdarmkrebs als protektiv zu bewerten. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass die Fällung der Gallensäuren und die Hemmung der Bildung sekundärer Gallensäuren in dem Prozess involviert sind (101). Letzteres wird durch die Absenkung der bakteriellen Enzymaktivität der 7 $\alpha$ -Dehydroxylase vermittelt (102, 103). Sekundäre Gallensäuren, wie Deoxycholsäure (DCA), werden durch die bakterielle Dehydroxylierung aus der primären Gallensäure Cholsäure (CA) im Dickdarm gebildet. DCA zeigt tumorpromovierende Eigenschaften, indem sie schädigend auf die Mukosa einwirkt und damit eine erhöhte Zellproliferation begünstigt (104). Aber auch eine Induktion von DNA-Schäden durch die DCA wird beschrieben, wodurch der Prozess der Krebsinitiation vorangetrieben wird (105). Unter diesen Gesichtspunkten wäre ein erhöhter Verzehr von Ballaststoffen mit der Folge einer erhöhten SCFA-Produktion als krebspräventiv einzustufen.

### 1.3.5 Präbiotika

Die Mikrobiota des humanen Darms besteht aus vorteilhaften, aber auch pathogenen Spezies. Durch die Ernährung lassen sich sowohl die Zusammensetzung als auch die Aktivitäten der Darmbakterien beeinflussen (106). Nahrungsbestandteile, die gezielt die Vermehrung „positiver“ Darmbakterien fördern, die als gesundheitsfördernd gelten, werden als Präbiotika bezeichnet. Gibson und Roberfroid haben diese folgendermaßen definiert: „*A prebiotic is a non-digestible food ingredient that beneficially affects the host by selectively stimulating growth, activity, or both of one or a limited number of bacterial species already resident to the colon*“ (107). Präbiotische Effekte wurden bisher vielen Nahrungsbestandteilen zugesprochen, teilweise sogar ohne Berücksichtigung der notwendigen zuvor definierten Kriterien (108). Um dies zu vermeiden, wurden zahlreiche Nicht-Stärke-Polysaccharide und Oligosaccharide als Substanzen mit präbiotischer Aktivität deklariert. Jedoch können nicht alle Kohlenhydrate als Präbiotika bezeichnet werden, so dass Gibson *et al.* im Jahr 2004 die Definition der Präbiotika mit klaren Kriterien aktualisiert hat. Diese Klassifizierung verlangt einen wissenschaftlichen Nachweis (*in vivo*) folgender Merkmale:

- Resistenz gegenüber der Magensäure, der Hydrolyse durch Verdauungsenzyme und der Absorption im Dünndarm
- Fermentation durch die Darmflora

- Selektive Stimulation des Wachstums und/oder der Aktivität von Darmbakterien, welche mit der Gesundheit und Wohlbefinden des Wirtes assoziiert sind (108).

Als protektiv wirkende Präbiotika werden neben Laktulose und resistenter Stärke vor allem die Fruktane des Inulin-Typs (wie Fruktooligosaccharide und Inulin) herausgestellt. *In vitro* und *in vivo* Studien belegen, dass Präbiotika mit einer erniedrigten Inzidenz von Dickdarmkrebs assoziiert sind (109, 110). Präbiotika wie Inulin stehen der Mikrobiota als Substrat zur Verfügung und führen durch die bakterielle Fermentation zur Bildung von SCFA (111). Insbesondere dem Butyrat werden zahlreiche biologische Effekte zugeschrieben, die chemopräventiv in die Kolonkarzinogenese eingreifen (86, 111). Hierbei sind beispielsweise Mechanismen, welche die Reduktion von DNA-Schäden, die Erhöhung der Expression und/oder Aktivität der *Phase II*-Entgiftungsenzyme GST und die Hemmung der Proliferation bereits entarteter Zellen vermitteln, involviert (110). In einer Tierstudie konnten Femia *et al.* einen protektiven Effekt durch die Gabe des Präbiotikums Oligofruktoseangereichertes Inulin gegenüber der Azoxymethan (AOM: Kanzerogen, welches experimentell als Tumorinduktor herangezogen wird)-induzierten Karzinogenese nachweisen (112). Verghese *et al.* zeigten in Ratten eine Reduktion der Inzidenz AOM-induzierter ACF (abberant crypt foci), die als präneoplastischer Marker für die Kolonkrebsentstehung gelten, nach einer lebenslangen Fütterung mit 10 g Inulin/Tag. Die stärkste Auswirkung auf die Reduktion präneoplastischer ACF wurde während der Promotionsphase der Karzinogenese beobachtet, wobei durch die Supplementation auch in der Initiationsphase eine Erniedrigung der ACF erreicht wurde (113). Rowland *et al.* beobachteten ebenso in einer Rattenstudie eine Reduktion AOM-induzierter ACF. Weiterhin wiesen sie eine Abnahme der enzymatischen Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase im Caecum der Ratten nach (114), welche an der Bildung von Kanzerogenen durch Reaktivierung dieser, z. B. durch die Spaltung glucuronierter Nitrosamine, beteiligt ist (115). Reddy diskutierte, dass vermutlich die Bildung der SCFA, insbesondere des Butyrates, vermutlich durch die Hemmung der Proliferation der betroffenen Zellen die Entstehung der ACF beeinflusst. Des Weiteren vermutet er, dass neben der Produktion der SCFA die Modulation der metabolischen Aktivität der Darmbakterien einen erheblichen Beitrag leistet (116).

In *in vitro* (117) und *in vivo* Studien (118) wurde untersucht, ob Inulin und Oligofruktose selektiv die Stimulation des Wachstums gesundheitsfördernder Bakterien beeinflusst. Es wurde ein erhöhtes Wachstum der *Bifidobacteria* beobachtet, wohingegen *Bacteroides*, *Fusobacteria* und *Clostridia* gehemmt wurden (117). Die *Bifidobacteria*, die sich auf Kos-

ten pathogener Keime ansiedeln, sind in der Lage, Kanzerogene zu binden und diese über den Fäzes auszuscheiden. Darüber hinaus resultiert die Verschiebung des Bakterienprofils zu Gunsten der *Bifidobacteria* in einer vermehrten Bildung von Laktat, wodurch der pH-Wert im Kolon abfällt. Infolgedessen werden eine bakterizide Umgebung für Pathogene (*E.coli*, *Clostridium perfringens*) und ein ideales Milieu für gesundheitsfördernde Bakterien geschaffen. Diese Bedingungen sind involviert in der Modulation von Enzymaktivitäten (z. B.  $\beta$ -Glucuronidase und/oder Nitroreduktase), die in Verbindung mit der Bildung von Kanzerogenen gebracht werden (102, 116).

Anhand dieser Datenlage ist ersichtlich, dass Präbiotika in der Aufrechterhaltung der Darmgesundheit eine wesentliche Rolle einnehmen. Daher könnte eine Aufnahme von Präbiotika präventiv in den Prozess der Kolonkarzinogenese eingreifen.

### 1.3.6 Probiotika

Der Ausdruck Probiotika beschreibt die Lebensmittel oder Nahrungssupplemente, welche lebende, genau definierte, gesundheitsfördernde Keime in ausreichendem Maße enthalten, um die Darmflora zu modulieren und darüber zum Wohlbefinden und der Gesundheit des Menschen beizutragen (119, 120). Darüber hinaus dürfen Probiotika nicht pathogen, nicht toxisch und resistent gegenüber des sauren Milieus im Magen und der Gallensalze sein, um ihr Überleben bis zu den unteren Darmabschnitten zu gewährleisten (121). Die meisten herkömmlichen Probiotika gehören zu den beiden Genera *Lactobacillus* (z. B. *L. casei*, *L. rhamnosus* und *L. acidophilus*) und *Bifidobacterium* (z. B. *B. bifidum* und *B. longum*) (119), wobei der Stamm *L. rhamnosus* GG (LGG) einen der bekanntesten und am häufigsten untersuchten probiotischen Stämme darstellt (122, 123).

Bereits im frühen 20. Jh. wurde erstmals durch Ilya Mechnikov vorgeschlagen, lebende Mikroorganismen zu verwenden, um die Darmgesundheit aufrechtzuerhalten und so das Leben zu verlängern (124). Die Liste der gesundheitsfördernden Wirkungen ist sehr umfangreich und beinhaltet u. a. die Verminderung der Symptome bei Laktoseintoleranz, die Reduktion des Serumcholesterins, Verringerung von entzündlichen Darmerkrankungen und antikanzerogene Effekte (125, 126). In *in vivo* Rattenstudien sind für ausgewählte Milchsäurebakterien der Gattungen *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* antikanzerogene Eigenschaften gegenüber chemisch-induzierten präneoplastischen Läsionen und Tumoren des Kolons beschrieben (127). Pool-Zobel *et al.* untersuchten die Wirkung verschiedener *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* auf die durch die Kanzerogene 1,2-Dimethylhydrazin

(DMH)- und *N*-methyl-*N*-Nitro-*N*-Nitrosoguanidin (MNNG)-induzierten DNA-Schäden in Kolonzyten von Ratten (128). Klinder *et al.* zeigten nach Applikation der Probiotika LGG und *Bifidobacterium animalis* supsp. *lactis* (Bb12) eine Abnahme des genotoxischen Potentials von Fäzeswässern AOM-behandelter Ratten (129). In zahlreichen weiteren Rattenstudien konnten eine verringerte Inzidenz und eine verminderte Größe AOM- sowie DHM-induzierter ACF durch eine oraler Gabe verschiedener Probiotika nachgewiesen werden (127).

Gleichwohl sind die genauen zugrundeliegenden Wirkmechanismen, mittels derer die Probiotika hemmend in den Prozess der Kolonkarzinogenese eingreifen könnten, noch nicht vollständig charakterisiert. Jedoch sind vielfältige mögliche protektive Mechanismen beschrieben (121, 130):

- Veränderung physikochemischer Bedingungen im Darm wie die Reduktion des pH-Wertes, wodurch eine Wachstumshemmung negativer Bakterien resultiert
- Veränderung der metabolischen Aktivität der Mikrobiota (z. B. Reduktion der enzymatischen Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase und Nitroreduktase, Erhöhung der Aktivität antioxidativer Enzyme wie Katalase oder SOD) durch eine Verschiebung des Bakterienprofils zugunsten gesundheitsfördernder Bakterien
- Aufbau und Aufrechterhaltung einer mikrobiellen Barriere gegen Fremdkeime
- Binden von potentiellen Kanzerogenen durch bifidogene Bakterien, was wiederum mit der Ausscheidung dieser über den Fäzes verbunden ist
- Bildung chemopräventiv-wirkender SCFA (z. B. Hemmung des Wachstum entarteter Kolonozyten)
- Produktion antibakterieller, -kanzerogener oder –mutagener Substanzen
- Stärkung der Immunabwehr
- Produktion von Vitaminen

### 1.3.7 Synbiotika

Synbiotika sind definiert als Gemisch von Prä- und Probiotika, welches den Wirt günstig beeinflusst, indem es das Überleben und Wachstum über die Nahrung aufgenommener probiotischer Keime im Gastrointestinaltrakt (GIT) verbessert, selektiv das Wachstum und die Aktivität einer begrenzten Anzahl bereits vorhandener gesundheitsfördernder Darmbakterien stimuliert und so die Gesundheit des Wirts fördert (131).

*In vitro* und *in vivo* Studien belegen, dass die Aufnahme von Synbiotika mit einer erniedrigten Inzidenz von Dickdarmkrebs assoziiert ist. Sowohl Tier- als auch Humanstudien konnten belegen, dass eine kombinierte Gabe von Prä- und Probiotika einen größeren krebspräventiven Effekt besitzt, als die jeweiligen Einzelkomponenten (112, 132-134). Rowland *et al.* gelang es, in einer Rattenstudie zu belegen, dass eine Kombination aus dem Präbiotikum Inulin und dem Probiotikum *Bifidobacterium longum* AOM-induzierte ACF vermindert, wobei dieser Effekt stärker ausfiel als nach alleiniger Behandlung mit den Einzelkomponenten (114). Des Weiteren wiesen sie durch diese Intervention eine reduzierte Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase und verminderte Ammoniakkonzentration im Caecum der Ratten nach. In einer Langzeituntersuchung mit AOM-behandelten Ratten führte eine Intervention mit einem Präbiotikum (Oligofruktose-angereicherter Inulin (Synergy1)), einem Probiotikum (LGG/Bb12) und einer Kombination aus beiden zur Reduktion der AOM-induzierten Tumore, wobei dieser Effekt vornehmlich durch den Verzehr des Synbiotikums zu beobachten war (112). Die Durchführung einer Rattenstudie durch Leu *et al.* zeigte insbesondere durch die synbiotische Aufnahme von resistenter Stärke und *Bifidobacterium lactis* eine Verringerung der Inzidenz und der Anzahl von AOM-induzierten Kolontumoren (135). In einer durch Rafter *et al.* durchgeführten Humanstudie mit Probanden, die ein erhöhtes Krebsrisiko aufwiesen, wurde ein Synbiotikum (Synergy1 & LGG/Bb12) hinsichtlich seines antikanzerogenen Potentials nach 12-wöchiger Intervention beobachtet. Die Ergebnisse verwiesen auf eine signifikante Reduktion des Proliferationsindex in den Kolonkrypten von "Polypen"-Patienten und deren Genotoxizität des Fäzeswassers (136).

## 1.4 Weizen

Der Weizen (*Triticum aestivum*) ist neben Reis und Mais eines der bedeutendsten, kultivierten Getreidesaaten weltweit. Nahezu 80 % seiner Produktion wird für die menschliche Ernährung verwendet. Hierbei trägt der Weizen beachtlich zur Energie- und Ballaststoffaufnahme bei (137).

Epidemiologische Studien belegen, dass die Aufnahme von Vollkornprodukten einen Schutz gegenüber Krebs, kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes und Übergewicht bietet. Die potentiell zugrundeliegenden Mechanismen sind unterschiedlich und komplex, da Vollkorn reich an zahlreichen, physiologisch relevanten Komponenten (z. B. Ballaststoffe, Vitamine, Mineralstoffe) und sekundären Pflanzenstoffen (z. B. Polyphenole, Lignane) ist

(138). Für einzelne Substanzen (z. B. Polyphenole, Ballaststoffe, Lignane) sind bereits gesundheitsfördernde Effekte beschrieben wurden (139).

#### 1.4.1 Aufbau des Weizenkorns

Das einzelne Weizenkorn besteht aus drei wesentlichen Teilen: der Schale als äußere Umhüllung, dem Keimling sowie dem Mehlkörper (Endosperm), der ca. 90 % des Korngewichts ausmacht. Die Schale setzt sich aus der Frucht- (Perikarp) und Samenschale (Testa) zusammen, wobei sich diese in eine Vielzahl weiterer Schichten untergliedern (Abb. 5). Die Schale umschließt die Aleuronschicht, welche das Endosperm vollständig umgibt und 7-9 % des Korns und 45-50 % der Kleiefraktion ausmacht (140). Das Weizenaleuron besteht aus einer Einzelschicht kubischer Zellen mit Zellwänden (doppelschichtig) von 6-8  $\mu\text{m}$  Dicke (141, 142). Das Endosperm enthält mit 75 % der Trockenmasse (TM) des Korns zum größten Teil Stärke. Der Stärke folgen Proteine (Glutenproteine) mit 10-11 % und Ballaststoffe mit 3-4 % der TM des Korns (143). Der Keimling sitzt am Kornrücken und enthält die Anlagen für Wurzel und Spross einer neuen Weizenpflanze.

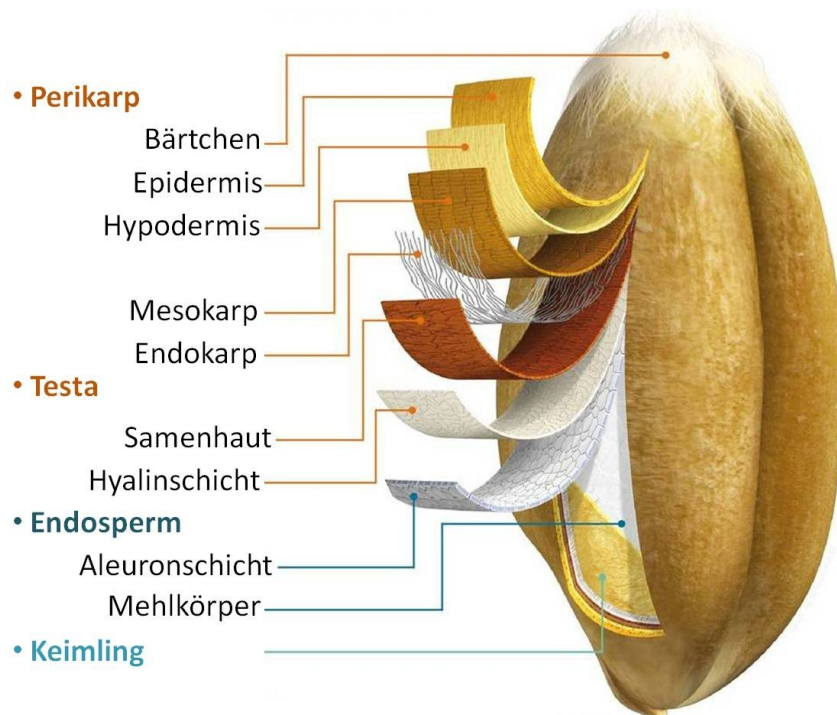


Abb. 5 Aufbau des Weizenkorns (KAMPFFMEYER Food Innovation GmbH, 2008)

#### 1.4.2 Zusammensetzung und Gewinnung der Aleuronfraktion

Die Aleuronschicht ist eine exzellente Quelle ernährungsphysiologisch wertvoller Substanzen wie Ballaststoffe, Mineralien, B-Vitamine, Proteine, Phytate und phenolische Verbindungen, die dort konzentriert vorliegen (141). Im Vergleich zum Endosperm sind die Aleuronproteine reich an der limitierenden essentiellen Aminosäure Lysin (141). Die Hauptfraktion der Ballaststoffe in den Zellwänden des Aleurons bilden die Arabinoxylane (ca. 65 %), gefolgt von der Zellulose und den  $\beta$ -Glucanen (140, 142). Die Ferulasäure, ein Derivat der Hydroxyzimtsäure, ist eine weitere bedeutende Komponente des Aleurons. Hier ist sie mit 98 % der Gesamtmenge eines Weizenkorns lokalisiert, wobei der größte Teil an Arabinoseeinheiten der Arabinoxylane in den Zellwänden gebunden ist. Nur etwa 10 % des Ferulasäuregesamtgehaltes liegt in freier, gelöster Form vor (144). Durch Dimerisierung zweier Ferulasäuremoleküle zu sogenannten Dehydrodimeren, bilden sich Brückenstrukturen zwischen benachbarten Arabinoxylanen aus, welche Auswirkungen auf den Vernetzungsgrad und damit auf die Zellwandstabilität haben (145). Die komplexe Matrix erschwert die Absorption im Verdauungstrakt. Nur durch eine exzessive bakterielle Metabolisierung im Dickdarm mittels Xylanasen und Esterasen kann die gebundene Ferulasäure freigesetzt werden. Untersuchungen von Kroon *et al.* belegten, dass über 95 % der Freisetzung von Ferulasäure während der Fermentation im Kolon stattfindet (146).

Bei der Verarbeitung des Weizens zu einem Auszugsmehl werden die Kleie und der Keimling abgetrennt. Obwohl die Aleuronschicht botanisch ein Teil des Endosperms einnimmt, wird sie zusammen mit der Frucht- und Samenschale während des Mahlprozesses abgetrennt (147). Mit Hilfe eines neu entwickelten und patentierten industriellen Prozesses ist es möglich, die Aleuronfraktion mit einer hohen Ausbeute und Reinheit aus der Kleie zu isolieren. Das Aleuron wird durch einen speziellen Mahlprozess vom Perikarp getrennt und durch verschiedene Reinigungsschritte isoliert. Dabei können Aleuronfraktionen mit unterschiedlicher Reinheit hergestellt werden (140). Der gesamte Prozess der Aleurongewinnung wurde durch Bohm *et al.* detailliert beschrieben (148).

#### 1.4.3 Chemopräventive Eigenschaften von Weizen

Mit der Ausnahme einer Rattenstudie existierten bisher weder *in vitro* noch *in vivo* Studien zum chemopräventiven Potential von isoliertem Weizenaleuron. McIntosh *et al.* konnten in einer Studie mit Ratten eine Reduktion AOM-induzierter Adenome im Kolon nach Gabe von Weizenaleuron nachweisen. Hierbei korrelierten die Butyratkonzentration und

die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase invers mit dem Auftreten der Adenome (149). Trotz der toxischen und mutagenen Wirkung der  $\beta$ -Glucuronidase, wurde diese als ein potentiell protektives Enzym der Darmflora diskutiert. Jenab und Thomson nahmen an, dass eine erhöhte enzymatische Aktivität die Freisetzung verschiedener protektiver, sekundärer Pflanzenstoffe aus ihrer konjugierten Form (z. B. Lignane) in das Darmlumen begünstigt (150).

Dennoch liegen für Weizenkleie, welche die Aleuronschicht beinhaltet, zahlreiche Studien vor, in denen krebspräventive Eigenschaften dieser angenommen werden. Lupton und Turner sowie Ferguson und Harris fassten in jeweils einem Übersichtsartikel viele epidemiologische und experimentelle Studien zu den möglichen protektiven Effekten der Weizenkleie zusammen (151, 152). In diesen führten sie auf, dass wahrscheinlich verschiedene Inhaltsstoffe der Weizenkleie (z. B. Ballaststoffe, Flavonoide, Polyphenole, Vitamin E) für eine inverse Korrelation zwischen der Aufnahme der Kleie und dem Auftreten von Kolontumoren verantwortlich sind. Hierbei wurden diese zugrundeliegende Mechanismen diskutiert: Bindung/Verdünnung von potentiellen Kanzerogenen und Tumorpromotoren wie Gallensäuren, Änderung der Transitzeit und Bildung von SCFA, insbesondere von Butyrat, dessen krebspräventives Potential noch immer Gegenstand zahlreicher Diskussionen darstellt. Außerdem wird vermutet, dass bisher noch unbekannte oder bereits neu beschriebene physiologische Effekte (z. B. Hemmung der Zelltransformation durch Apoptoseinduktion, Aktivierung von Tumorsuppressorgenen) von weiteren protektiven Inhaltsstoffen (z. B. Phytoöstrogene, Phytinsäure) ausgehen (151). Dennoch können die protektiven Mechanismen nicht getrennt voneinander betrachtet werden, so dass vielmehr ein komplexes Zusammenspiel vermutet wird (141).

Ferguson *et al.* untersuchten unter Verwendung von Ratten den Einfluss von Weizenkleie auf die Bildung von ACF nach Applikation von 2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinolin (IQ). Die Ergebnisse wiesen auf einen Schutz gegenüber der Bildung von ACF hin (153). Eine weitere Rattenstudie belegte eine signifikante Reduktion der Anzahl AOM-induzierter ACF nach einer Supplementation von Weizenkleie (154). Darüber hinaus konnte in einer Rattenstudie von Femia *et al.* ein chemopräventives Potential von Arabinoxylan-Oligosacchariden, ein Inhaltsstoff der Weizenkleie, beobachtet werden. Dieser Effekt äußerte sich in einer Verminderung DMH-induzierter ACF im distalen Kolon von Ratten nach Intervention mit den Arabinoxylan-Oligosacchariden (155).

In der humanen Interventionsstudie „Australian polyp prevention project“ wurden Personen, bei denen bereits ein oder mehrere Polypen im Dickdarm entfernt wurden, nach 1-



2-jähriger Supplementation von Weizenkleie hinsichtlich ihres Krebsrisikos untersucht. Die Supplementation reduzierte tendenziell das Entstehungsrisiko für sekundäre Adenome mit einem Durchmesser von größer 10 mm (156). Reddy *et al.* (1999) untersuchten den Effekt einer 8-wöchigen Intervention mit 13-15 g Weizen-, Hafer- oder Maiskleie auf Gallensäuren und bakteriellen Enzyme des Dickdarms von weiblichen Probanden. Eine Abnahme verschiedener Gallensäuren (z. B. DCA) und eine Reduktion bakterieller Enzymaktivitäten (z. B. 7 $\alpha$ -Dehydroxylase) wurden nach Intervention im Stuhl der Probandinnen beobachtet, wobei die Weizenkleie die stärksten Effekte aufwies (157). Eine weitere Humanstudie belegte ein erhöhtes Stuhlvolumen und eine verminderte Transitzeit nach dem Verzehr von Weizenkleie (158), was einen verringerten Kontakt von Tumorpromotoren mit dem Kolonepithel zur Folge hat.

Die Bildung von SCFA durch die Fermentation von Weizenkleie und Arabinoxylanen konnte *in vitro* bestätigt werden (159, 160). Des Weiteren resultierte die Fermentation in einer Abnahme von Ammoniak und sekundären Gallensäuren (159). Außerdem waren die gewonnenen Fermentationsproben in der Lage, das Wachstum von Adenokarzinomzellen zu hemmen, die Aktivität von Entgiftungsenzymen zu erhöhen und Hydroxynonenal (HNE)- sowie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte DNA-Schäden zu reduzieren (160). Eine andere Studie zeigte einen antikanzerogenen Effekt von Ferulasäure gegenüber einer AOM-induzierten Karzinogenese in Ratten, welcher mit einer Induktion ausgewählter Entgiftungsenzyme assoziiert war (161).

Darüber hinaus könnte ein möglicher inverser Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Weizenkleie und dem Risiko für Kolorektalkrebs in der Beeinflussung der Zusammensetzung der Mikrobiota des Kolons begründet sein. So konnte ein präbiotisches Potential von Weizeninhaltsstoffen unter Verwendung von Fermentationsmodellen *in vitro* nachgewiesen werden (162-164). Ferner spiegelte sich ein Verzehr verschiedener Weizenprodukte (Weizenzerealien und Arabinoxylan-Oligosaccharide) sowohl bei Nagern (Ratten, Mäuse) (165, 166) als auch beim Menschen (167) in einer Zunahme der *Lactobacilli* und der *Bifidobacteria* in den jeweiligen Stuhlproben wider.

## 1.5 *In vitro* Fermentationsmodelle

Um den Einfluss von Ballaststoffen und weiteren Nahrungsinhaltsstoffen auf die Darmgesundheit zu untersuchen, müssen geeignete Analyseverfahren zur Untersuchung dieser Effekte unter Beachtung physiologischer Bedingungen herangezogen werden. In diesem

Zusammenhang werden Humanstudien als besonders relevant erachtet. Jedoch ist der Zugriff auf humanes Material wie Darminhalt und –gewebe sowohl aus praktischen als auch aus ethischen Gründen begrenzt.

Verschiedene Methoden wurden herangezogen, um die Verdauung und die Fermentation von Ballaststoffen sowie die damit verbundenen Konsequenzen zu analysieren. Macfarlane *et al.* untersuchten Metabolite der bakteriellen Fermentation im Kolon von plötzlich verstorbenen Personen (168). Dahingegen stellt die Verwendung von humanen Fäzesproben zur Bestimmung der Fermentationsmetabolite, wie der SCFA, ein wesentlich besseren Ansatz dar. Jedoch ist auch die Aussagekraft dieser Methode begrenzt, da beispielsweise ein Großteil der SCFA im Darm absorbiert wird. Daher ist die Einsatz von Ileostomie-Patienten eine gute Alternative zur Erfassung der Absorption und Ausscheidung von Nährstoffen (169). Aufgrund der Einschränkung von Humanstudien, werden in diesem Bereich oft Tierstudien durchgeführt. Hierbei ist es von Vorteil, dass die Tiere kontrolliert ernährt werden und der Darminhalt und das Darmgewebe leicht zugänglich sind. Trotz dessen ist die Übertragbarkeit auf den Menschen nur beschränkt möglich, da sich physiologische Prozesse und die Mikrobiota der Versuchstiere von denen der Menschen unterscheiden (170). Daher wurden in den vergangenen Jahren diverse *in vitro* Modelle etabliert, mit dessen Hilfe die Verdauung und die Fermentation simuliert werden können.

Zum einen umfassen diese Modelle ein einfaches durch Barry *et al.* (171) etabliertes „one-batch“-Fermentationssystem und komplexe, mehrstufige, kontinuierlich ablaufende Systeme (172-176), welche ausgewählte oder alle Passagen des GIT nachahmen.

Barry *et al.* berichtete bereits von einer *in vitro* Fermentationsmethode zur Simulation des Dickdarms, die schnell und relativ einfach („one-batch“-System) durchführbar und weniger kostenaufwendig als komplexe Modelle ist, wodurch eine hohe Probenanzahl getestet werden kann (171). Sie wird zur Charakterisierung verschiedener Ballaststoffe verwendet. Hierbei werden diese mit einer humanen Fäzessuspension, meist hergestellt aus mehreren Fäzesproben gesunder Probanden und einem spezifischen Fermentationsmedium, unter anaeroben Bedingungen inkubiert. In den anschließend gewonnen Fermentationsproben werden vorrangig folgende Endpunkte bestimmt: SCFA-Konzentrationen, Verbrauch des Ballaststoffes, Gasproduktion, pH-Werte, Gallensäuren und Bakterienpopulation.

Die Verwendung komplexer Ballaststoffquellen ist jedoch problematisch. Lebet *et al.* beobachteten, dass hohe Mengen von Stärke die Fermentation des Ballaststoffes und die damit verbundenen Konsequenzen maskiert (177). Durch das Einführen eines Vorverdaus (Simulation von Mund, Magen und Dünndarm) konnten diese Probleme behoben werden.

Allerdings eignen sich diese einfachen *in vitro* Modelle nicht, um langfristige Effekte (z. B. Veränderungen der Mikrobiota) zu untersuchen. Physiologische Bedingungen wie die unterschiedlichen Dickdarmabschnitte, eine kontinuierliche Enzymzugabe und die Kontrolle der pH-Werte können in diesen Systemen nicht berücksichtigt werden.

Durch mehrstufige, kontinuierliche Systeme zur GIT-Simulation können komplexe Lebensmittel oder Nahrungsbestandteile unter nahezu physiologischen Bedingungen über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Das kontinuierlich ablaufende SHIME (simulated human intestinal microbial ecosystem)-modell nach Molly *et al.* (176) simuliert in einem komplexen 5-Stufenmodell die Abschnitte: Duodenum/Jejunum, Ileum, Caecum/Colon ascendens, Colon transversum und Colon descendens. Da die Absorption von Metaboliten nicht simuliert wird, erfolgen hauptsächlich Untersuchungen zur Erfassung der Interaktion einer Testsubstanz mit der Mikrobiota sowie zur Entstehung von Fermentationsmetaboliten, wie den SCFA. Das Computer-kontrollierte TIM-Modell (TNO Intestinal Models) nach Minekus *et al.* (172, 175) ist ein sehr komplexes, hochentwickeltes System zur Simulation von Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon, mit welchem gezielt die physiologischen Gegebenheiten (z. B. Peristaltik, pH-Werte, Temperatur, Absorption von Wasser, Spalt- und Fermentationsprodukten, Transitzeit) im GIT reproduziert werden können. Das TIM-Modell wird häufig herangezogen um *in vitro* folgende Parameter zu bestimmen: Verdauung von Nahrungsbestandteilen und vollständigen Mahlzeiten, Verhalten von Arzneimitteln, Verhalten aufgenommener Mikroorganismen und der Mikrobiota des Kolons.

Neben der Erfassung bereits genannten Parameter ergibt sich außerdem die Möglichkeit, krebspräventive bzw. kanzerogene Effekte bestimmter Nahrungsmittel sowie deren Inhaltsstoffe im Zusammenhang mit den komplexen Einflüssen, die vom Wachstum und/oder Metabolismus der Darmflora ausgehen, zu analysieren. Hierfür kann die Wirkung der *in vitro* gewonnenen Fermentationsüberstände (FÜ; Fermentationsproben, welche nach der Dickdarmsimulation vorliegen) in humanen Kolonzelllinien untersucht werden – ein neues Gebiet im Bereich der Kolonkrebsforschung (170). Insbesondere kann mit Hilfe dieser zellkulturbasierenden Untersuchungen der Einfluss der gewonnen komplexen FÜ auf die molekularen Mechanismen der Chemoprävention erforscht werden. Jedoch weisen die FÜ, welche aus einer Simulation des gesamten GIT resultierten (SHIME, TIM), im Zellkulturmodell ein zytotoxisches Potential auf, wobei diese Zytotoxizität auf die während der Dünndarmsimulation eingebrachten Gallensäuren zurückgeführt wurde (178). Ein für die nachfolgenden Untersuchungen geeignetes Modell stand damit bisher nicht zur Verfügung.

## 2 Zielstellung

Dickdarmkrebs ist ursächlich mit der Ernährung verbunden. Diese kann Risikofaktoren enthalten, die Mutationen auslösen und Krebs initiieren, aber auch Stoffe liefern, die der Krebsentstehung entgegenwirken.

In der vorliegenden Arbeit sollten *in vitro* Untersuchungen zur Erfassung chemopräventiver Eigenschaften von Weizenaleuron in humanen Kolonzellen Hinweise über einen möglichen gesundheitsfördernden Beitrag einer Aleuron-reichen Ernährung liefern. Hierbei lag der Fokus insbesondere auf Parametern der Primärprävention, welche die Hemmung der Initiation der Krebsentstehung beschreiben.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Etablierung eines Verdauungs- und Fermentationssystems auf der Grundlage des *in vitro* Fermentationssystems von Barry *et al.* (171) und des Modells zur Simulation des oberen GIT von Aura *et al.* (179). Das etablierte Modell sollte den Verdau und die Fermentation des Weizenaleurons unter weitgehend physiologischen Prozessen nachahmen (**Publikation I**). Die daraus resultierenden FÜ wurden in allen folgenden Experimenten eingesetzt.
- Charakterisierung der generierten FÜ hinsichtlich entstehender Fermentationsmetabolite (HPLC-MS/MS, GC/MS).
- Charakterisierung der gewonnen Fermentationspellets hinsichtlich des Einflusses von Weizenaleuron auf die bakterielle Zusammensetzung (*real-time* qPCR).
- Untersuchung des Potentials der generierten FÜ, die Genexpression von Enzymen der Biotransformation und der antioxidativen Abwehr zu modulieren (Custom-Array, *real-time* qPCR) (**Publikation II**).
- Nachweis von Effekten der FÜ auf Enzymaktivitäten (spektrophotometrische Messungen) (**Publikation II**).
- Bestimmung des Effektes von FÜ auf die DNA-Integrität (Comet-Assay) (**Publikation II**).
- Klärung, ob durch eine Kofermentation (Verdau und Fermentation) des Weizenaleurons mit den Probiotika *Bifidobacterium bifidum* 12 (Bb12) und *Lactobacillus rhamnosus* GG<sup>®</sup> (LGG<sup>®</sup>) die zuvor untersuchten Parameter beeinflusst werden (**Publikation III**).

### 3 Publikationen<sup>1</sup>

#### 3.1 Publikation I: Modification of an *in vitro* model simulating the whole digestive process to investigate cellular endpoints of chemoprevention.

Katrin Stein, Anke Borowicki, Daniel Scharlau, Kerstin Scheu, Gerald Brenner-Weiß, Ursula Obst, Jürgen Hollmann, Meinolf Lindhauer, Norbert Wachter, Michael Glei. *British Journal of Nutrition* 2011 Mar;105(5):678-78.

Um den Einfluss komplexer Nahrungsbestandteile auf die Darmgesundheit untersuchen zu können, müssen geeignete Analyseverfahren zur Erfassung dieser Effekte unter Beachten physiologischer Gegebenheiten herangezogen werden. *In vitro* Fermentationsmodelle haben zum Ziel, die Verhältnisse im Verdauungstrakt annähernd physiologisch zu simulieren. Bisher zeigten Fermentationsproben, welche mittels bereits bestehender komplexer *in vitro* Systemen generiert wurden, zytotoxische Eigenschaften in Zellkulturexperimenten. Um krebspräventive bzw. kanzerogene Eigenschaften von komplexen Fermentationsproben in Zellkultur untersuchen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein bereits etabliertes *in vitro* Fermentationssystem (Dickdarm) um die Simulation von Mund, Magen und Dünndarm einschließlich Dialyse erweitert. Insbesondere durch den Einsatz einer Dialyse und eine Anpassung der eingesetzten Gallensäuremengen an physiologische Bedingungen konnten zytotoxischen Effekte der Fermentationsproben vermindert werden. Unter Verwendung des erweiterten *in vitro* Modells ist es möglich, den Einfluss komplexer Lebensmittel und Nahrungsbestandteile auf die Entstehung von Dickdarmkrebs in *in vitro* Zellkulturmodellen zu erfassen.

##### Eigenanteil:

- Anteilige Durchführung und Modifikation der *in vitro* Fermentation
- Anteilige Durchführung und Auswertung der Wachstumsuntersuchungen
- Anteilige Auswertung der analytischen Untersuchungen
- Anteilige Interpretation und Darstellung der Ergebnisse
- Verfassung des Manuskriptes

---

<sup>1</sup> Weitere Publikationen die nicht in den engeren thematischen Zusammenhang der Dissertation gehören, erscheinen in der Publikationsliste am Ende der Arbeit. Experimentelle Arbeiten und anteilige Verfassung von Manuskripten meinerseits während der Promotionszeit führten zur Aufführung im Autorenverzeichnis.

## Modification of an *in vitro* model simulating the whole digestive process to investigate cellular endpoints of chemoprevention

Katrin Stein<sup>1\*</sup>, Anke Borowicki<sup>1</sup>, Daniel Scharlau<sup>1</sup>, Kerstin Scheu<sup>2</sup>, Gerald Brenner-Weiß<sup>2</sup>, Ursula Obst<sup>2</sup>, Jürgen Hollmann<sup>3</sup>, Meinolf Lindhauer<sup>3</sup>, Norbert Wachter<sup>4</sup> and Michael Glei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Nutritional Toxicology, Institute for Nutrition, Friedrich-Schiller-University Jena, Dornburger Strasse 24, 07743 Jena, Germany

<sup>2</sup>Department of Microbiology of Natural and Technical Interfaces, Research Center Karlsruhe, Institute of Functional Interfaces (IFG), Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

<sup>3</sup>Max Rubner-Institute, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Schützenberg 12, 32756 Detmold, Germany

<sup>4</sup>Kampffmeyer Food Innovation GmbH, Trettaustr. 32-34, 21107 Hamburg, Germany

(Received 19 May 2010 – Revised 23 September 2010 – Accepted 24 September 2010 – First published online 28 January 2011)

### Abstract

*In vitro* gut fermentation systems are relevant tools to study health benefits of foodstuffs. Most of them are commonly used to investigate the degradation of nutrients or the development of gut flora. Using these models, strong cytotoxic effects of the resulting samples on cultured cells were observed. Hence, the aim of the present study was to develop a modified *in vitro* fermentation model that simulates the whole digestive tract and generates fermented samples that are suitable for testing in cell culture experiments. Wholemeal wheat flour (wwf) was digested and fermented *in vitro* with a fermentation model using different ox gall concentrations (41.6 and 0.6 g/l). The resulting fermentation supernatants (fs) were characterised for metabolites and biological effects in HT29 cells. The fermentation of wwf increased chemopreventive SCFA and decreased carcinogenic deoxycholic acid (DCA). The strong cytotoxic effects of the fs, which were partly due to cholic acid and DCA, were diminished by lowering the ox gall concentration, allowing the use of the samples in cell culture experiments. In conclusion, an *in vitro* digestion model, which can be used to study the effects of foodstuffs on chemoprevention and gut health in colon cells, is introduced and its physiological relevance is demonstrated.

**Key words:** Chemoprevention: Deoxycholic acid: Fermentation: SCFA: Wheat

Several epidemiological studies have suggested that diet and lifestyle play a major role in carcinogenesis, especially in colon cancer<sup>(1,2)</sup>. The gastrointestinal tract (GIT) is continuously exposed to xenobiotics and endogenous metabolites, which can cause colorectal cancer or other diseases of the colon such as inflammatory bowel disease. Thus, chemoprevention of colorectal cancer is a major concern for improving public health. The consumption of dietary fibre from fruits and grains might be associated with a reduced risk of colorectal cancer development, whereby high but also lower amounts may exert beneficial effects<sup>(3,4)</sup>. Nevertheless, it is apparent that more detailed studies are needed on how different types of foods and dietary fibres contribute to gut health and how they may act on a molecular basis. In particular, it is of interest to better understand overall metabolism, the roles of individual compounds formed during the process of gut fermentation and how these fermentation metabolites

interact with each other in a chemopreventive mode of action with colon epithelial cells. Therefore, to characterise the *in vivo* situations more precisely, it makes sense to determine the underlying mechanism *in vitro*. *In vitro* gut fermentation systems are thought to reflect conditions in the GIT which make them a relevant tool, with the advantages of low costs and relatively easy performance, to study health benefits and risks of foodstuffs and nutrients, metabolites of food digestion as well as effects on the colonic microflora. To determine how the intestinal epithelium is influenced by different gut metabolites in detail, it is useful to investigate the effects of fermentation samples in colon cell culture experiments. Only a few such cell culture studies are available, and most of them investigated the effects of fermentation samples from single substances, in particular dietary fibre, obtained from basic *in vitro* fermentation models that only mimic the large intestine<sup>(5–8)</sup>. Those studies highlighted the positive

**Abbreviations:** CA, cholic acid; DCA, deoxycholic CA; fs, fermentation supernatants; GIT, gastrointestinal tract; wwf, wholemeal wheat flour.

\*Corresponding author: K. Stein, fax +49 3641949672, email stein.katrin@googlemail.com

effects of fermentation samples on colon cancer prevention by mechanisms that could retard tumour promotion and progression. The research of complex foodstuffs (e.g. wheat flour) on colon cancer prevention is more difficult because next to the fermentation process, the digestion and absorption of nutrients should be additionally taken into account. So far, detailed evidence is missing how the resulting fermentation products of complex foods interact with human colon cells.

Several *in vitro* models including a simple single-batch fermentation system described by Barry *et al.*<sup>(9)</sup> as well as more complex multistage continuous models<sup>(10–14)</sup>, which can simulate selected or all passages of the whole digestive tract, have been developed. Since samples from previous *in vitro* multistage continuous systems have been shown to have cytotoxic effects in cell culture experiments<sup>(7)</sup>, they are only used to elucidate the role of microbiota in the metabolism of all non-digestible parts of the diet<sup>(15)</sup> and to analyse fermentation products, e.g. SCFA, bile acids and NH<sub>3</sub><sup>(13)</sup>. Fassler *et al.*<sup>(7)</sup> suggested that the high cytotoxic activity of the fermentation samples is probably due to compounds (especially bile acids) added during *in vitro* fermentation which made them unsuited for any of the cell-based bioassays for cancer. In addition, they also showed a high cytotoxicity of the bile acid deoxycholic acid (DCA)<sup>(7)</sup>. Moreover, several other researchers have reported that bile acid concentration is highly correlated with the cytotoxicity of faecal water<sup>(16–18)</sup>. So far, information about a toxic influence of other compounds required during the process does not exist.

Therefore, the aim of the present study was to establish a new *in vitro* model, simulating the whole GIT based on two previously designed models by Barry *et al.*<sup>(9)</sup> and Aura *et al.*<sup>(19)</sup>, suitable for subsequent cell culture experiments. A reduction of the added ox gall concentration to 0.6 g/l in our newly established model simulating the whole digestive tract is thus a critical parameter to use these samples in cell culture experiments. Therefore, the samples obtained using an optimised *in vitro* model protocol may be used to study the effects of different foodstuffs on colon cell lines and can therefore improve the outcome of *in vitro* studies. Moreover, fermentation products (SCFA and bile acids), generated by using different *in vitro* model conditions, were determined, and the influence of the samples on the number of HT29 colon cancer cells was measured. Furthermore, the efficiency of digestive enzymes and dialysis, which simulates the absorption of small molecular metabolites, was investigated.

## Materials and methods

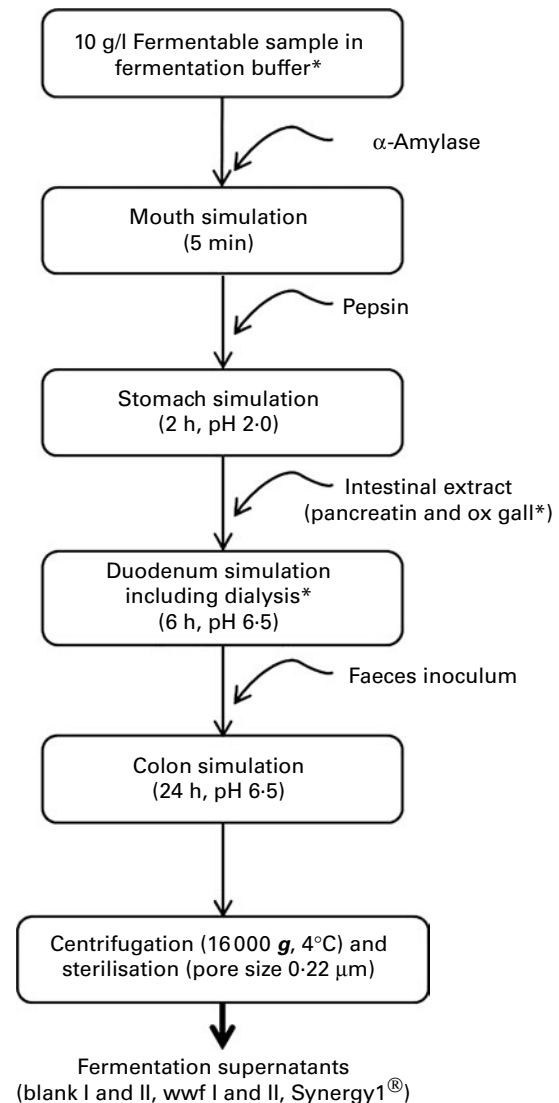
### Dietary fibre sources

Wholemeal wheat flour (wwf) from Kampffmeyer Food Innovation GmbH (Hamburg, Germany) was used as a source of dietary fibre. The composition of wwf was

reported by Borowicki *et al.*<sup>(20)</sup>. Synergy1<sup>®</sup>, a commercially available mixture of inulin enriched with oligofructose, was obtained from Orafit (Tienen, Belgium). To maintain the stability of samples, aliquots were prepared and stored in air- and light-proof flasks at 4°C.

### Fermentation of dietary fibre sources

Wwf was digested and fermented *in vitro* in a batch culture system according to Aura *et al.*<sup>(19,20)</sup> and Barry *et al.*<sup>(9)</sup> with some modifications (Fig. 1). In detail, simulation of the



**Fig. 1.** Procedure of the *in vitro* fermentation method according to Aura *et al.*<sup>(19,20)</sup> and Barry *et al.*<sup>(9)</sup> with some modifications (denoted by \*). In detail, simulation of the upper gastrointestinal tract designed by Aura *et al.*<sup>(19)</sup> was modified by the insertion of a dialysis step for the removal of the digested products and by the change of the amount as well as the solvent for the samples before mouth simulation. So, the samples were dissolved according to the protocol designed by Barry *et al.*<sup>(9)</sup> using a potassium phosphate fermentation buffer (0.1 M, pH 7.0) instead of a nutritive medium. The faecal control (blank) and wholemeal wheat flour (wwf) were digested and fermented using 41.6 g/l (I) or 0.6 g/l (II) of ox gall in the intestinal extract. Synergy1<sup>®</sup> was digested and fermented using 0.6 g/l (II) of ox gall in the intestinal extract.

upper GIT designed by Aura *et al.*<sup>(19)</sup> was modified by the insertion of a dialysis step for the removal of the digested products and by the change of the amount as well as the solvent for the samples before mouth simulation. So, the samples were dissolved according to the protocol designed by Barry *et al.*<sup>(9)</sup> using a potassium phosphate fermentation buffer (0.1 M, pH 7.0) instead of a nutritive medium. Two fermentation series, with different ox gall concentrations (fermentation I, 41.6 g/l; fermentation II, 0.6 g/l) in the intestinal extract for simulation of the small intestine, were conducted. Dietary fat accounts for 30% of the body's energy requirement per day considering a balanced diet. This results in a daily secretion of 20–30 g bile acids during the digestion of foods containing a moderate fat content<sup>(21)</sup>. Hence, with regard to fat content and amount of the applied wheat source, a theoretical value of 0.6 g/l ox gall in the intestinal extract is required to achieve more physiological bile acid concentrations during the *in vitro* simulation of digestion. Moreover, for the statistical evaluation of the fermentation procedure, the well-characterised dietary fibre source Synergy1<sup>®</sup> was digested and fermented *in vitro* in three repetitions.

Wwf was weighed (0.5 g fermentable material) into glass bottles and mixed with 10 ml potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0). A sample without wwf was used as a control (blank). All the following incubations were performed at 37°C in a continuously shaking water-bath. Salivary  $\alpha$ -amylase (Sigma, Taufkirchen, Germany) diluted to 1000 U/ml with 20 mM-sodium phosphate buffer (17.36 U/sample) and 0.85% (w/v) NaCl were added, and the samples were incubated for another 5 min. HCl solution (150 mM, 2.81 ml) was added to lower the pH to 2.0. Pepsin (Sigma) dissolved in 0.94 ml of 20 mM-HCl was added to each sample and incubated for 2 h at 37°C. An intestinal extract was prepared by dissolving 208 mg (fermentation I) or 3 mg (fermentation II) ox gall (Fluka-Sigma), respectively, and 2.6 mg pancreatin (Sigma) in 5 ml sodium bicarbonate buffer (11 mM, pH 6.5). This solution (5 ml) was added to each sample or blank, the pH was adjusted to 6.5 using NaOH solution (10 M) and the suspension (25 ml) was transferred into a dialysis tube (molecular weight cut-off 1000 Da) (Roth, Karlsruhe, Germany). The tubes were placed into glass bottles filled with 2 litres of the dialysis buffer (13.61 g potassium phosphate and 1.88 g sodium bicarbonate dissolved in distilled water, pH 6.5) and incubated for 6 h at 37°C under semi-anaerobic conditions. Semi-anaerobic conditions in the glass bottles were achieved by removing a part of the air with an injected cannula (0.5 bar for 1 min) and, subsequently, filling the bottles with the fermentation gas mixture (86% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> and 4% H<sub>2</sub> at 37°C) via the cannula (0.8 bar for 1 min). After 15 min (seven cycles repeated), the cannulae were removed. At the end of the incubation, the suspension was transferred from the dialysis tube into a 500 ml glass bottle, and the pH of each sample was measured.

Thereafter, the *in vitro* fermentation was performed according to the method described by Glei *et al.*<sup>(5)</sup>. Faecal homogenate (25 ml) was mixed with the digested wheat samples (as previously described; final concentration of wheat sample: 10 g/l), and the pH was adjusted to 6.5 using NaOH solution (10 M). *In vitro* fermentation was conducted under anaerobic conditions which were achieved by removing the available air with an injected cannula (0.5 bar for 1 min). Subsequently, the bottles were filled with the fermentation gas mixture via the cannula (0.8 bar for 1 min). After 30 min (fifteen cycles repeated), the cannulae were removed and the fermentation suspensions were incubated for 24 h in a shaking water-bath at 37°C. Afterwards, the fermentation process was stopped by placing the suspensions on ice, and the pH was measured with a pH meter (Hydrus 300; Fisherbrand, Schwerte, Germany). Each sample was centrifuged (4200 g at 4°C) for 30 min. Supernatants were centrifuged again (4200 g at 4°C) for 15 min and stored at –80°C. Before sterilisation of the fermentation supernatants (fs), the samples were thawed quickly, aliquoted in 2 ml tubes and centrifuged (16 000 g at 4°C). Afterwards, the fs were sterilised by filtration (pore size, 0.22  $\mu$ m) to obtain the final fs for use in cell culture experiments.

To investigate the functionality of digestion enzymes and dialysis during wwf digestion, the remaining suspensions, dialysates (dialysis buffer containing low-molecular (<1000 Da) digested products and bile acids) and retentates (suspension in the dialysis tube), obtained by simulation of mouth to the small intestine using 0.6 g/l ox gall, were stored at –80°C until further analysis.

#### Determination of bile acids

Bile acids were determined in the intestinal extract, retentate as well as dialysate, and in all fs by HPLC-MS/MS. Therefore, the fs were diluted 1:10 using potassium phosphate buffer. In total, 20  $\mu$ l cholic acid (CA)-*d*<sub>4</sub> (50  $\mu$ g/ml) were added as an internal standard. The sample enrichment was performed by neutral solid-phase extraction with 200 mg 101 sorbent columns (Separtis, Grenzach-Wyhlen, Germany). The columns were preconditioned with 10 ml methanol, 15 ml distilled water and 5 ml potassium phosphate buffer. The sample was applied onto the cartridge and allowed to pass through by gravity and water jet vacuum pump. Afterwards, the cartridge was washed with 10 ml distilled water and dried with N<sub>2</sub>, and the bile acids were eluted with 5 ml methanol. The eluted substances were dried at 45°C under N<sub>2</sub>, and the residue was dissolved in 1 ml 10 mM-NH<sub>4</sub>OAc–acetonitrile (50:50, v/v). HPLC-MS/MS was performed according to Burkard *et al.*<sup>(22)</sup> with an Agilent 1100 Series HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany). Bile acids were separated on an RP-C8 column (100  $\times$  4 mm, 5  $\mu$ m; MZ-Analysentechnik, Mainz, Germany). The injection volume was 20  $\mu$ l. The mobile phase consisted of 10 mM-ammonium acetate



buffer, pH 5.0, containing 0.012% formic acid (eluent A) and acetonitrile (eluent B). The eluents were linearly changed from 70% A and 30% B to 30% A and 70% B within 38 min, held for 10 min, and finally adjusted to the original ratio of 70% A and 30% B within 2 min and held for 15 min to equilibrate the column. The column flow rate was set to 0.5 ml/min during the entire analysis. The detection of bile acids was performed with a tandem mass spectrometer API 4000 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Toronto, Canada) equipped with an ESI ionisation source operating in the negative mode at  $-4.5$  kV at  $450^{\circ}\text{C}$ . Bile acids were recorded in the multiple-reaction-monitoring mode at  $m/z$   $407.2 \rightarrow 343.2$  CA,  $m/z$   $411.2 \rightarrow 347.2$  (CA- $d_4$ ) and  $m/z$   $391.2 \rightarrow 345$  DCA. A validation of the method was done using enriched standards from 0.02 to 2.0 mg/l ( $n$  3). Repeatability, standard deviation, limit of detection and limit of quantification were calculated according to the German Standard DIN 32645.

#### Analysis of glucose concentrations

The amount of glucose was analysed in the retentate and dialysate as well as in the starting raw material by high-performance anion-exchange chromatography on a DIONEX BioLC system (DIONEX Corporation, Sunnyvale, CA, USA) according to Hollmann & Lindhauer<sup>(23)</sup>.

#### Determination of SCFA

SCFA in the fs were determined by GC combined with MS (GC/MS) as described by Wang *et al.*<sup>(24)</sup> with some modifications. Briefly, the fs were diluted 1:50 using potassium phosphate buffer to a final volume of 1 ml, and 2-ethyl butyric acid was added as an internal standard. The samples were acidified with 20  $\mu\text{l}$  HCl solution (32%), and SCFA were extracted by shaking the samples two times with 700  $\mu\text{l}$  *tert*-butyl methyl ether. The organic phases were collected, and 1 ml of the respective organic phases was derivatised with 20  $\mu\text{l}$  trimethylsulphonium hydroxide solution (Fluka, Buchs, Switzerland) in methanol (10%, v/v) for 20 min at room temperature. In total, 2  $\mu\text{l}$  aliquots of the derivatised samples were injected into a GC-MS (Varian Saturn 2000) onto a Stabilwax-DA column (30 m  $\times$  0.25 mm internal diameter  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ; Restek, Bellefonte, PA, USA). He gas was used as a carrier. The chromatographic conditions were as follows:  $60^{\circ}\text{C}$  held for 2 min,  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  until  $150^{\circ}\text{C}$ , held for 1 min and  $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$  until  $240^{\circ}\text{C}$ , held for 10 min. For the detection of the SCFA, the mass spectrometer was used in the full-scan mode. A method validation was carried out using enriched six-point calibration functions from 5 to 100 mg/l ( $n$  3). Repeatability, standard deviation, limit of detection and limit of quantification were calculated according to the German Standard DIN 32645.

#### Preparation of synthetic bile acid mixtures

The preparation of the synthetic mixtures of the two main bile acids, CA and DCA, contained in the fs blank and wwf of fermentation I and II was based on the analysis of bile acids in the fs I and II from our present experiments. Investigations using the synthetic mixtures were expected to reveal which cellular effects were caused by the bile acids in the fs. Therefore, sodium cholate hydrate (Sigma) and sodium deoxycholate (Sigma) in the determined concentrations were dissolved in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL, Eggenstein, Germany) cell culture medium supplemented with 10% fetal calf serum.

#### Cell culture

The human colon adenocarcinoma cell line HT29 was established in 1964 by Fogh (Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre, New York, NY, USA)<sup>(25)</sup> and was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). The cells (passages 30–40) were maintained as a subconfluent monolayer cultured in a supplemented Dulbecco's modified Eagle's medium at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 95% humidified incubator (5%  $\text{CO}_2$ ). The cultured cells were trypsinised with 5 ml of trypsin–versene (1:10, v/v) for 4 min and subcultivated at dilutions of 1:5 to 1:10 in T<sub>75</sub> flasks. In regular intervals, a mycoplasma test (MycoAlert™ Detection Kit; Lonza Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) was performed, and contamination with mycoplasma was excluded.

#### Measurement of the cell number

The determination of cytotoxicity of different test substances mainly proceeds by indirect (e.g. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) assay) or direct measurements (e.g. trypan blue exclusion test) of the cell number as an accepted marker which is often used in *in vitro* studies<sup>(26–29)</sup>. We decided on the DAPI assay by which the amount of the measured DAPI-labelled DNA is related to the number of cells.

The number of colon cells was determined in ninety-six-well microtitre plates. At 24 h after seeding, the cells were incubated with 2.5–20.0% (v/v) of all fs diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium to determine cytotoxicity. After 24, 48 and 72 h, the cell number was measured as described<sup>(30)</sup>. Results were calculated on the basis of the medium control which was set to equal 100%.

#### Statistical analysis

All experiments apart from the fermentation (I and II) of wwf were conducted independently at least three times. Means and standard deviations were calculated from at

least three independent experiments. Differences were calculated with GraphPad Prism version 5.02 for Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) using one- or two-way ANOVA with Bonferroni's post-test with selected pairs or Student's *t* test. The statistical analyses used depended on the respective experimental design and are specified in the legends to the figures and tables.

## Results

### Bile acids in fermentation supernatants

It is important to note that the two applied ox gall concentrations contained different amounts of bile acids (fermentation I: 645  $\mu\text{M}$ -CA, 423  $\mu\text{M}$ -DCA; fermentation II: 9  $\mu\text{M}$ -CA, 6  $\mu\text{M}$ -DCA). Levels of bile acids, both CA and DCA, in the fs were in general higher than those in the applied intestinal extracts, due to the added faecal sample. High concentrations of CA were detected in fs blank I (1562  $\mu\text{M}$ ) and in fs wwI (656  $\mu\text{M}$ ). The concentration of DCA was highest in the fs blank I (502  $\mu\text{M}$ ). The use of the low ox gall concentration resulted in a reduced amount of DCA in fs wwI (2  $\mu\text{M}$ ) and in fs blank II (26  $\mu\text{M}$ ). Noteworthy is the fact that the fermentation of wwI reduced the potential toxic secondary bile acid DCA independently of the ox gall concentration (wwI, 2  $\mu\text{M}$ ; wwII, 2  $\mu\text{M}$ ).

### SCFA and pH in fermentation supernatants

The fs were further characterised for their contents of SCFA and pH after 24 h anaerobic fermentation. The amount of SCFA in both fs wwI and II was markedly increased in comparison with the respective fs blank (Table 1). The amount of butyrate was highest in fs wwII. Furthermore, the relative proportion of butyrate slightly increased. Interestingly, the relative and absolute propionate concentrations in the samples of fs I were higher than those in the fs II samples, whereas butyrate levels increased in the latter. Fermentation of wwI resulted in a clearly decreased pH compared with the fs blank. Lowered pH may reflect the increased total amount of the SCFA by active microflora.

**Table 1.** Concentration and molar ratios of SCFA as well as pH in fermentation supernatants (fs) of the faecal control (blank) and whole-meal wheat flour (wwI) after fermentation I (41.6 g/l ox gall) and II (0.6 g/l ox gall)

	fs blank I	fs wwI	fs blank II	fs wwII
pH	6.61	5.19	6.54	5.09
SCFA (mM)				
Acetate	23.49	60.68	24.15	74.00
Propionate	17.61	53.38	12.15	23.67
Butyrate	5.62	17.85	9.48	30.30
Total SCFA (mM)	46.72	131.91	45.77	128.50
Ratio of SCFA (%)	50:38:12	46:40:14	53:27:20	58:19:23

### Effects of fermentation supernatants on the cell growth of HT29

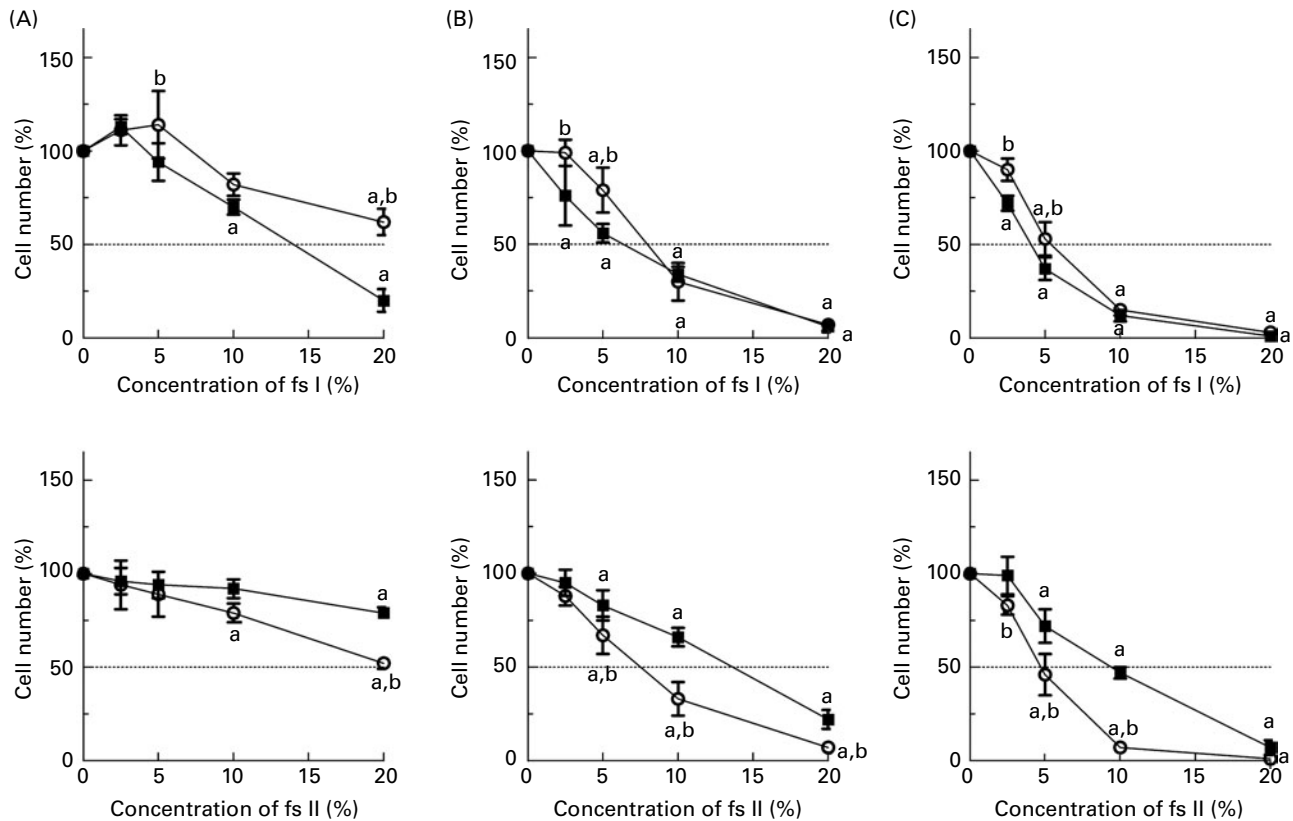
Fig. 2 shows the effects of the fs blank and fs wwI of fermentation I and II on the cell growth of HT29 cells. The treatment of HT29 cells with the fs of fermentation I (fs blank and fs wwI) and II (fs blank and fs wwI) resulted in a significant time- and dose-dependent decrease of surviving cells. In comparison, the effects of fs blank I were significantly different from those of fs blank II, whereby fs blank I was the most cytotoxic of all samples with an inhibitory concentrations leading to 50% reduction of cell number of 14.1 (SD 1.2)% (Table 2) after 24 h of treatment. The reduced cytotoxicity of fs blank II with an inhibitory concentrations leading to 50% reduction of cell number of 13.4 (SD 1.1)%, which was reached only after 48 h, indicates that residual ox gall must be involved in the reduction of the cell number. Moreover, fs blank I was more cytotoxic than the corresponding fs wwI, whereas fs wwII was more effective than fs blank II in the inhibition of cell growth.

### Effects of synthetic mixtures of cholic acid and deoxycholic acid on the number of HT29 cells

To characterise the role of bile acids in the inhibition of cell growth, HT29 cells were treated with synthetic mixtures of CA and DCA, which were prepared according to their corresponding complex fs blank and fs wwI of fermentation I and II, respectively (Fig. 3). The number of HT29 cells was only decreased time dependently by the synthetic bile acid mixture of fs blank I (48 and 72 h). However, in comparison with the complex fs blank I (Fig. 2), it was significantly less effective. All other synthetic mixtures of complex fs (fs wwI, fs blank II and fs wwII) had no effect on the cell number.

### Efficacy of digestion enzymes and dialysis

To investigate the efficiency of digestion and dialysis, we characterised the retentate and dialysate (0.6 g/l ox gall in the intestinal extract) for their contents of glucose and bile acids. Digestion of wwI resulted in a total increased amount of glucose in the dialysate (3.64 mg absolute) and retentate (12.64 mg absolute) compared with the raw material (0 mg). This demonstrates an effective enzymatic degradation of starch and at least partial dialysis of glucose during simulation of the small intestine. Furthermore, most of the amounts of the inserted bile acids, CA (blank, 510  $\mu\text{M}$ ; wwI, 380  $\mu\text{M}$ ) and DCA (blank, 330  $\mu\text{M}$ ; wwI, 260  $\mu\text{M}$ ) were found in the dialysates (blank: 360  $\mu\text{g}$  CA, 280  $\mu\text{g}$  DCA; wwI: 230  $\mu\text{g}$  CA, 190  $\mu\text{g}$  DCA), which also proofed the functionality of dialysis during simulation of the upper digestive tract.



**Fig. 2.** Effects of fermentation supernatants (fs) I (upper graphs) and II (lower graphs) of the faecal control (blank, ■) and wholemeal wheat flour (wwf, ○) using 41.6 or 0.6 g/l of ox gall in the intestinal extract on the HT29 cell number after 24 h (A), 48 h (B) and 72 h (C) incubation. The signal of the medium control was set to equal 100 %. Values are means with standard deviations depicted by vertical bars (*n* 3). <sup>a</sup>One-way ANOVA with Bonferroni's post test with selected pairs was used to calculate the differences to the medium control (*P* < 0.05). <sup>b</sup>Two-way ANOVA with Bonferroni's post test was used to calculate the differences between blank and wwf (*P* < 0.05).

### Statistical evaluation of fermentation II

In order to statistically validate the newly established fermentation protocol II, Synergy1<sup>®</sup>, a well-analysed dietary fibre, was fermented in three independent experiments according to the protocol described in Fig. 1. Key parameters, namely concentrations of SCFA and bile acids, were then analysed in the obtained fs. The fermentation of Synergy1<sup>®</sup> resulted in a strong and significant decrease of DCA (2.23 (SD 2.07)  $\mu$ M) and a non-significant decrease of CA (0.27 (SD 0.19)  $\mu$ M) compared with the fs blank (DCA, 36.06 (SD 10.27)  $\mu$ M; CA, 0.36 (SD 0.12)  $\mu$ M) (Table 3). The total SCFA concentration in the fs Synergy1<sup>®</sup> was about a threefold increase (*P* < 0.1) in comparison with the blank. In addition, a significant increase of butyrate by approximately fourfold was observed (blank, 6.65 (SD 2.52)  $\mu$ M; Synergy1<sup>®</sup>, 27.28 (SD 2.64)  $\mu$ M). The values of the increase in total SCFA as well as butyrate were almost comparable to those obtained by the fermentation II from wwf (total SCFA, threefold; butyrate, threefold; Table 1), which also attributes to the use of the same amount of the fermentable substance of each sample. Thus, these results statistically support the reproducibility of the established protocol of fermentation II.

### Discussion

#### SCFA production

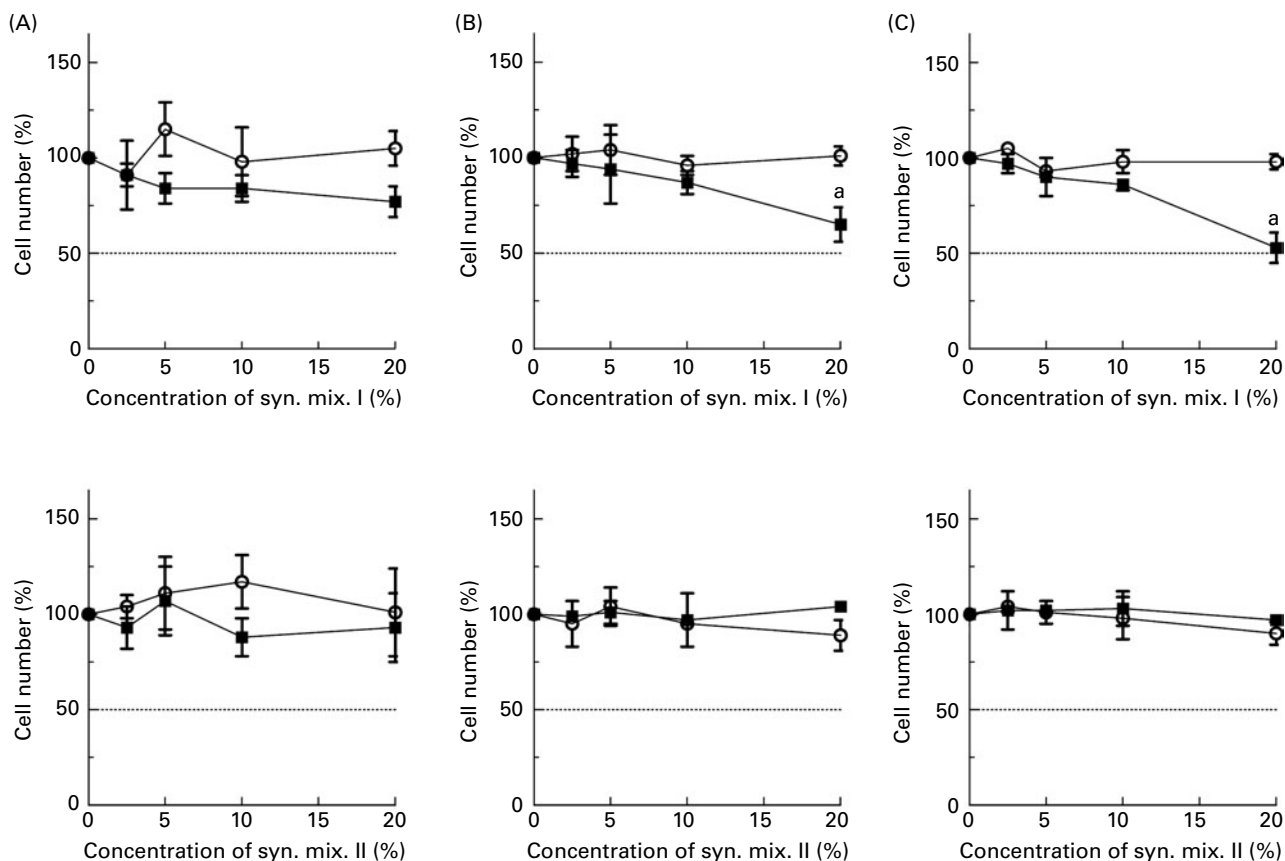
Major metabolites of the gut flora-mediated fermentation of foodstuffs are SCFA, which result in a lower pH in the colon. Special attention is being paid to the ratio of SCFA, since they exhibit different physiological functions and effects. Various population survey data showed that

**Table 2.** Inhibitory concentrations leading to a 50% reduction of cell number (EC<sub>50</sub>) after incubation of HT29 cells with fermentation supernatants (fs) of the faecal control (blank) and wholemeal wheat flour (wwf) after fermentation I (41.6 g/l ox gall) and II (0.6 g/l ox gall)\* (Mean values and standard deviations, *n* 3)

	EC <sub>50</sub> (%)							
	fs blank I		fs wwf I		fs blank II		fs wwf II	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
24 h	14.1	1.2	×	×	×	×	×	×
48 h	6.3	1.1	8.6 <sup>b</sup>	0.8	13.4 <sup>c</sup>	1.1	7.7 <sup>b</sup>	1.7
72 h	3.9	0.5	6.5 <sup>b</sup>	0.5	9.8 <sup>c</sup>	0.8	4.6 <sup>b</sup>	0.4

×, EC<sub>50</sub> was not achieved.

\* Student's *t* test was used to calculate the differences between the respective fs blank (b: *P* < 0.05) and between the respective sample of the fermentation I and II (c: *P* < 0.05).



**Fig. 3.** Effects of corresponding synthetic mixtures (syn. mix.) of cholic acid and deoxycholic acid of the complex fermentation supernatants I (upper graphs) and II (lower graphs) of the faecal control (blank, ■) and wholemeal wheat flour (wwf, ○) using 41.6 or 0.6 g/l of ox gall in the intestinal extract on the HT29 cell number after 24 h (A), 48 h (B) and 72 h (C) incubation. The signal of the medium control was set to equal 100%. Values are means and standard deviations depicted by vertical bars (*n* 3). \*One-way ANOVA with Bonferroni's post test with selected pairs was used to calculate the differences to the medium control (*P*<0.05).

faecal SCFA production is in the order of acetate > propionate > butyrate in a molar ratio of approximately 60:20:20 to 60:25:15, respectively<sup>(31,32)</sup>. Total SCFA concentrations have been found to range from 49 to 147 mM depending on the consumed diet as well as the region of the colon<sup>(33)</sup>. In the present study, the total SCFA concentrations increased after both fermentation series of the wheat samples from 47 and 45 mM to 132 and 128 mM, respectively, as well as after the fermentation of Synergy1<sup>®</sup> from 45 to 118 mM. Therefore, the detected values are comparable to physiological concentrations. These results are in line with previous studies using a simple *in vitro* fermentation model according to Barry *et al.*<sup>(9)</sup>, in which SCFA concentrations increased two- to threefold compared with the faecal control after the fermentation of arabinoxylans<sup>(5)</sup> and Synergy1<sup>®</sup><sup>(34)</sup>.

In the present study, the statistical evaluation of the complex fermentation model II demonstrated the reproducibility by a comparable increase of total SCFA and butyrate after each fermentation (*n* 3) of Synergy1<sup>®</sup>. Furthermore, in other studies using the introduced *in vitro* fermentation II to digest a number of different substrates, namely wwf, wheat bran, wheat aleurone<sup>(20)</sup> as well as of different wheat and rye breads (our unpublished results) and nuts

(our unpublished results), a comparable increase in the amounts of SCFA was detected. In addition, the reproducibility of the underlying *in vitro* fermentation simulating the colon was approved in a European interlaboratory study during the estimation of fermentability of dietary fibre sources by Barry *et al.*<sup>(9)</sup>. Here, in most cases, very similar

**Table 3.** Concentrations and molar ratios of SCFA as well as concentrations of bile acids (cholic (CA) and deoxycholic acid (DCA)) in fermentation supernatants (fs) of the faecal control (blank) and Synergy1<sup>®</sup> after fermentation II using 0.6 g/l ox gall\* (Mean values and standard deviations, *n* 3)

	fs blank		fs Synergy1 <sup>®</sup>	
	Mean	SD	Mean	SD
SCFA (mM)				
Acetate	16.71	4.39	43.23 <sup>(b)</sup>	18.52
Propionate	7.08	4.39	12.50	9.23
Butyrate	6.65	2.52	27.28 <sup>b</sup>	2.64
Total SCFA (mM)	30.44	30.44	83.01 <sup>(b)</sup>	30.35
Bile acids (μM)				
CA	0.36	0.12	0.27	0.19
DCA	36.06	10.27	2.23 <sup>b</sup>	2.07

\* Student's *t* test was used to calculate the differences to the fs blank (b: *P*<0.05). Parentheses denote the effect varying by trend (*P*<0.10).



results regarding SCFA production were found during a ring test, even though some interlaboratory differences of unknown origin remained.

The ratio of SCFA shifted slightly from acetate to propionate and butyrate (fermentation I) or to butyrate only (fermentation II) during the bacterial fermentation of wwF. In addition, fermentation (series II) of Synergy1® showed a shift towards butyrate which was comparable to wwF II. A particular interest in butyrate has arisen because of its potential preventive role against colon cancer<sup>(35)</sup>. Butyrate can have numerous biological effects, such as inducing apoptosis in tumour cells<sup>(36)</sup> and protecting cells from genotoxic insults by elevating phase II detoxification<sup>(37,38)</sup>. Therefore, the high production of SCFA *in vitro* is possibly an indication of protective effects by the diet.

Interestingly, the physiological amount of propionate constituting 20–25 % of the total SCFA amount clearly exceeded during fermentation I, whereas the concentration after fermentation II was still physiological<sup>(31,32)</sup>. Zampa *et al.*<sup>(39)</sup> showed that after the fermentation of xylo-oligosaccharides, propionate concentrations were high after 6 d of fermentation and then decreased, while butyrate started with low values and then increased to its highest values. During the first 6 d, the primary bile acid CA was converted into the corresponding secondary bile acid DCA with a conversion rate of more than 90 %. Additionally, it was observed that primary bile acid metabolism and the production of butyrate are inversely related during fermentation. Therefore, our observed high-propionate and low-butyrate proportions could possibly be a result of a reduced growth of butyrate-producing bacteria caused by the high-bile acid concentrations used in fermentation I.

### Bile acid production

In general, our investigations showed that the fermentation of wwF and Synergy1® resulted in low levels of the secondary bile acid DCA, produced by bacterial conversion of primary bile acids. DCA has shown tumour-promoting properties by acting directly on the mucosa or by promoting the effects of carcinogenic substances present in the intestine<sup>(39)</sup>. Thus, the reduction of DCA can be regarded as positive in terms of colon cancer prevention. Besides reducing the solubility of bile acids, the lower pH can also reduce the activity of 7 $\alpha$ -dehydroxylases, which are responsible for the conversion of primary to secondary bile acids<sup>(40)</sup>. Additionally, DCA may bind to dietary fibre, as has been demonstrated for CA and chenodeoxycholic acid by Elhardallou<sup>(41)</sup> who showed the binding of these bile acids by a fibre-rich fraction of different legumes. These results suggest that the dietary fibre sources wwF and Synergy1® may reduce the amounts of carcinogenic DCA in the colon. This finding is in line with the studies of our group using different sources of dietary fibres<sup>(34,42)</sup>.

### Effects on cell number

Several *in vitro* studies have indicated that SCFA, especially butyrate, reduce the growth of transformed colon cells<sup>(6,34,42)</sup>, a parameter of secondary chemoprevention<sup>(43)</sup>. The generated fs used in the present study also led to an efficient reduction of the number of HT29 cells, whereas fs blank I exhibited the strongest effect. A synthetic mixture of CA and DCA of the corresponding complex fs blank I reduced the growth of HT29 cells significantly but less than the corresponding fs. Therefore, bile acids are apparently involved in growth reduction by fs blank I, but other factors in the complex fs seem to enhance these effects. A study by Shiraki *et al.*<sup>(44)</sup> supports these findings, because 100  $\mu$ M-DCA reduced the proliferation rate of HT29. The change in ox gall concentration (0.6 g/l) used for the *in vitro* fermentation II resulted in fs wwF II, which was more effective in reducing cell growth than the corresponding blank II. Noteworthy, the less decreasing activity of fs blank II is comparable with other faecal controls, which were obtained with a single *in vitro* fermentation system and successfully used in further cell culture experiments<sup>(5,34)</sup>. Therefore, under these more physiological conditions comparable to a daily secretion of 20–30 g bile acids<sup>(21)</sup>, the contained SCFA seem to be more important for the reduced cell growth than the contained reduced concentrations of bile acids (CA, 66–132  $\mu$ M; DCA, 0.2–0.4  $\mu$ M). Additionally, other ingredients of the fs such as antioxidant and anti-mutagenic compounds such as hydroxycinnamic acids might have contributed to the detected inhibition of cell growth, as was suggested by Beyer-Sehlmeyer *et al.*<sup>(6)</sup>. However, the high ox gall concentration (41.6 g/l) that was used for other *in vitro* models of digestion and for our fermentation I resulted in highly cytotoxic fermentation samples, and the contained bile acids apparently masked the effects of other, more physiological metabolites such as SCFA. A reduction of the ox gall to 0.6 g/l in our newly established model simulating the whole digestive tract is thus a critical parameter to use these samples in cell culture experiments. Therefore, the samples obtained using this optimised protocol can be used to study the effects of different foodstuffs on colon cell lines, and can therefore improve the outcome of *in vitro* studies.

### Efficacy of *in vitro* fermentation

Predigestion of starch by  $\alpha$ -amylase as well as the subsequent removal of glucose by dialysis is important for the following *in vitro* fermentation. It has been previously demonstrated that the fermentation of starch and glucose can result in high SCFA concentrations<sup>(45,46)</sup>. Therefore, these compounds can mask the results of dietary fibre fermentation if these compounds are not previously degraded and removed.

In our experiments, an effective degradation of starch contained in wwf was demonstrated by increased concentrations of glucose in the retentate and dialysate. This reflects the hydrolysis of starch by added  $\alpha$ -amylase and is in accordance with the results of Aura *et al.*<sup>(19)</sup>. In addition, this confirmed the subsequent removal of glucose by dialysis. Furthermore, the detection of the majority of the inserted bile acids in the dialysate demonstrated the efficiency of the dialysis. These results thus indicate that dialysis is an effective step to simulate absorption of small molecules occurring in the small intestine. But it has also to be kept in mind that the presented model is only an approach to physiological conditions. A complete physiological and selective absorption is limited by the absence of brush border enzymes. This is, however, a limitation that our model shares with all other available models simulating human digestion *in vitro*.

In conclusion, we introduce a modified *in vitro* digestion system that mimics the whole GIT. The samples obtained with this simulation can be used in cell culture experiments to study the effects of foodstuffs on colon cells. The reduction of high ox gall concentrations used in other models diminished cytotoxic side effects and enables an unmasked analysis of the effects of fermentation metabolites on cells. The fermentation of two different dietary fibre sources, namely wwf and Synergy1<sup>®</sup> (inulin enriched with oligofructose) using the presented system, resulted in the production of potentially chemopreventive metabolites such as SCFA, on the one hand, and a reduction of the tumour-promoting secondary bile acid DCA, on the other hand. Therefore, the designed protocol can successfully be used to study the effects of different nutrients and foodstuffs on colon cancer prevention and general markers of gut health in human colon cell cultures. Thus, the described *in vitro* fermentation model has already proved to be successful in subsequent investigations studying the chemopreventive effects (e.g. induction of apoptosis, differentiation and detoxification) of different fermented wheat sources<sup>(20,47–49)</sup>.

### Acknowledgements

The authors would like to thank the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF 0313829A) for funding. K. S., A. B., D. S. and M. G. designed the research and wrote the manuscript. K. S. and A. B. prepared the synthetic mixtures and performed the *in vitro* fermentation as well as the experiments on cell number measurements. K. S., G. B.-W. and U. O. performed the analysis of SCFA and bile acids and wrote the part describing the corresponding methods. J. H. and M. L. performed the analysis of glucose. N. W. provided wwf. We gratefully acknowledge the excellent technical assistance by Ms Esther Woschke. The authors have no conflicts of interest.

### References

1. Doll R & Peto R (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* **66**, 1191–1308.
2. Pool-Zobel B, van Loo J, Rowland I, *et al.* (2002) Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *Br J Nutr* **87**, Suppl. 2, S273–S281.
3. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (2007) *Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington DC: AIRC.
4. Tan KY & Seow-Choen F (2007) Fiber and colorectal diseases: separating fact from fiction. *World J Gastroenterol* **13**, 4161–4167.
5. Gleis M, Hofmann T, Kuster K, *et al.* (2006) Both wheat (*Triticum aestivum*) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect human colon cells from genotoxic activities of 4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide. *J Agric Food Chem* **54**, 2088–2095.
6. Beyer-Sehlmeyer G, Gleis M, Hartmann E, *et al.* (2003) Butyrate is only one of several growth inhibitors produced during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre sources. *Br J Nutr* **90**, 1057–1070.
7. Fassler C, Gill CI, Arrigoni E, *et al.* (2007) Fermentation of resistant starches: influence of *in vitro* models on colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* **58**, 85–92.
8. Klinder A, Gietl E, Hughes R, *et al.* (2004) Gut fermentation products of inulin-derived prebiotics beneficially modulate markers of tumour progression in human colon tumour cells. *Int J Cancer Prev* **1**, 19–32.
9. Barry JL, Hoebler C, Macfarlane GT, *et al.* (1995) Estimation of the fermentability of dietary fibre *in vitro*: a European interlaboratory study. *Br J Nutr* **74**, 303–322.
10. Minekus M, Marteau P, Havenaar R, *et al.* (1995) A multicompartamental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small-intestine. *Altern Lab Anim* **23**, 197–209.
11. Gibson GR, Cummings JH & Macfarlane GT (1988) Use of a 3-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Appl Environ Microbiol* **54**, 2750–2755.
12. Macfarlane GT, Cummings JH, Macfarlane S, *et al.* (1989) Influence of retention time on degradation of pancreatic enzymes by human colonic bacteria grown in a 3-stage continuous culture system. *J Appl Bacteriol* **67**, 520–527.
13. Minekus M, Smeets-Peters M, Bernalier A, *et al.* (1999) A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 108–114.
14. Molly K, Vande WM & Verstraete W (1993) Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl Microbiol Biotechnol* **39**, 254–258.
15. Aura AM (2005) *In vitro* digestion models for dietary phenolic compounds. PhD Dissertation, Helsinki University of Technology.
16. Lapré JA & Van der Meer R (1992) Diet-induced increase of colonic bile acids stimulates lytic activity of fecal water and proliferation of colonic cells. *Carcinogenesis* **13**, 41–44.
17. Rafter JJ, Child P, Anderson AM, *et al.* (1987) Cellular toxicity of fecal water depends on diet. *Am J Clin Nutr* **45**, 559–563.
18. Venturi M, Hambly RJ, Glinghammar B, *et al.* (1997) Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile

acids: a study using the alkaline comet assay. *Carcinogenesis* **18**, 2353–2359.

19. Aura AM, Härkönen H, Fabritius M, *et al.* (1999) Development of an *in vitro* enzymatic digestion method for removal of starch and protein and assessment of its performance using rye and wheat breads. *J Cereal Sci* **29**, 139–152.
20. Borowicki A, Stein K, Scharlau D, *et al.* (2010) Fermented wheat aleurone inhibits growth and induces apoptosis in human HT29 colon adenocarcinoma cells. *Br J Nutr* **103**, 360–369.
21. Bhagavan NV (2002) Gastrointestinal digestion and absorption. In *Medical Biochemistry*, 4th ed., pp. 216–217 [S Harcourt Science and Technology Company, editor]. New York: Academic Press.
22. Burkard I, von Eckardstein A & Rentsch KM (2005) Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **826**, 147–159.
23. Hollmann J & Lindhauer MG (2005) Pilot-scale isolation of glucuronarabinoxylans from wheat bran. *Carbohydr Polym* **59**, 225–230.
24. Wang JF, Zhu YH, Li DF, *et al.* (2004) *In vitro* fermentation of various fiber and starch sources by pig fecal inocula. *J Anim Sci* **82**, 2615–2622.
25. Rousset M (1986) The human colon carcinoma cell lines HT-29 and caco-2: two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* **68**, 1035–1040.
26. Radu M, Munteanu MC, Petrache S, *et al.* (2010) Depletion of intracellular glutathione and increased lipid peroxidation mediate cytotoxicity of hematite nanoparticles in MRC-5 cells. *Acta Biochim Pol* **57**, 355–360.
27. Sauer J, Richter KK & Pool-Zobel BL (2007) Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J Nutr Biochem* **18**, 736–745.
28. Gleim M, Klenow S, Sauer J, *et al.* (2006) Hemoglobin and heme induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. *Mutat Res* **594**, 162–171.
29. Vantikommu J, Palle S, Surendra RP, *et al.* (2010) Synthesis and cytotoxicity evaluation of novel 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles via CuI catalysed 1,3-dipolar cycloaddition. *Eur J Med Chem* **45**, 5044–5050.
30. Klenow S, Gleim M, Haber B, *et al.* (2008) Carob fibre compounds modulate parameters of cell growth differently in human HT29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells. *Food Chem Toxicol* **46**, 1389–1397.
31. Wong JM, de SR, Kendall CW, *et al.* (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* **40**, 235–243.
32. Cummings JH (1981) Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* **22**, 763–779.
33. Scheppach W, Bartram P, Richter A, *et al.* (1992) Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa *in vitro*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **16**, 43–48.
34. Munjal U, Gleim M, Pool-Zobel BL, *et al.* (2009) Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. *Br J Nutr* **102**, 663–671.
35. Amrein TM, Gränicher P, Arrigoni E, *et al.* (2003) *In vitro* digestibility and colonic fermentability of aleurone isolated from wheat bran. *Lebensm Wiss Technol* **36**, 451–460.
36. Pool-Zobel BL & Sauer J (2007) Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans. *J Nutr* **137**, 2580S–2584S.
37. Pool-Zobel BL, Selvaraju V, Sauer J, *et al.* (2005) Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* **26**, 1064–1076.
38. Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, *et al.* (2009) Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat Res* **682**, 39–53.
39. Zampa A, Silvi S, Fabiani R, *et al.* (2004) Effects of different digestible carbohydrates on bile acid metabolism and SCFA production by human gut micro-flora grown in an *in vitro* semi-continuous culture. *Anaerobe* **10**, 19–26.
40. Ridlon JM, Kang DJ & Hylemon PB (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* **47**, 241–259.
41. Elhardallou SB (1992) The bile acids binding of the fibre-rich fractions of three starchy legumes. *Plant Foods Hum Nutr* **42**, 207–218.
42. Hofmann T, Weber A, Sauer J, *et al.* (2008) Formation of tumour promoting and tumour inhibitory products during gut flora mediated fermentation of inulin-type fructans and wheat bran. *J Clin Biochem Nutr* **43**, 1–5.
43. Bonovas S, Tsantes A, Drosos T, *et al.* (2008) Cancer chemoprevention: a summary of the current evidence. *Anticancer Res* **28**, 1857–1866.
44. Shiraki K, Ito T, Sugimoto K, *et al.* (2005) Different effects of bile acids, ursodeoxycholic acid and deoxycholic acid, on cell growth and cell death in human colonic adenocarcinoma cells. *Int J Mol Med* **16**, 729–733.
45. Mortensen PB, Holtug K & Rasmussen HS (1988) Short-chain fatty acid production from mono- and disaccharides in a fecal incubation system: implications for colonic fermentation of dietary fiber in humans. *J Nutr* **118**, 321–325.
46. Lebet V, Arrigoni E & Amadò R (1998) Digestion procedure using mammalian enzymes to obtain substrates for *in vitro* fermentation studies. *Lebensm Wiss Technol* **31**, 509–515.
47. Borowicki A, Stein K, Scharlau D, *et al.* (2010) Fermentation supernatants of wheat (*Triticum aestivum* L.) aleurone beneficially modulate cancer progression in human colon cells. *J Agric Food Chem* **58**, 2001–2007.
48. Borowicki A, Michelmann A, Stein K, *et al.* (2010) Fermented wheat aleurone enriched with probiotic strains LGG and Bb12 modulates markers of tumor progression in human colon cells. *Nutr Cancer* (In the Press).
49. Stein K, Borowicki A, Scharlau D, *et al.* (2010) Fermented wheat aleurone induces enzymes involved in detoxification of carcinogens and in antioxidative defence in human colon cells. *Br J Nutr* **104**, 1101–1111.

### 3.2 Publikation II: Fermented wheat aleurone induces enzymes involved in detoxification of carcinogens and in antioxidative defence in human colon cells.

Katrin Stein, Anke Borowicki, Daniel Scharlau, Michael Glei. *British Journal of Nutrition* 2010 Oct;104(8):1101-11.

Weizenaleuron enthält zahlreiche gesundheitsfördernde Bestandteile, insbesondere Ballaststoffe, welche im Dickdarm partiell oder vollständig durch die intestinale Darmflora fermentiert werden. Kurzkettige Fettsäuren (SCFA), vor allem Butyrat, werden als bedeutende Fermentationsprodukte angesehen. Bisher wurden zahlreiche chemopräventive Eigenschaften von Butyrat postuliert. So könnte eine Induktion von Enzymsystemen, welche in der Entgiftung von Kanzerogenen und der antioxidativen Abwehr involviert sind, zur Prävention von Dickdarmkrebs beitragen. Diese Studie sollte Informationen über den Einfluss der FÜ des Weizenaleurons auf die Expression genannter Enzymsysteme und damit verbundene funktionelle Konsequenzen sowohl in gesunden als auch in entarteten humanen Kolonzellen liefern. Der FÜ des Weizenaleurons induzierte die Expression von *SULT2B1*, *GSTP1* und *Katalase* sowie die Gesamtaktivität der GST und Katalase. Eine Verringerung H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter DNA-Schäden in HT29 war möglicherweise auf die gesteigerten Enzymaktivitäten zurückzuführen. Die aufgezeigten Veränderungen könnten Kolonzellen vor Kanzerogenen sowie vor reaktiven Sauerstoffspezies schützen und damit der Krebsentstehung entgegenwirken.

#### Eigenanteil:

- Anteilige Durchführung der *in vitro* Fermentation
- Isolierung und Aufarbeitung der Kolongewebeproben
- RNA-Isolation, Durchführung der *real-time* qPCR und anteilige Durchführung des Custom-Arrays
- Bestimmung der Enzymaktivitäten (Katalase, GST) und der Antigenotoxizität
- Auswertung, Interpretation und Darstellung der Ergebnisse
- Verfassung des Manuskriptes



## Fermented wheat aleurone induces enzymes involved in detoxification of carcinogens and in antioxidative defence in human colon cells

Katrin Stein\*, Anke Borowicki, Daniel Scharlau and Michael Glei

Department of Nutritional Toxicology, Institute for Nutrition, Friedrich-Schiller-University Jena, Dornburger Strasse 24, 07743 Jena, Germany

(Received 13 October 2009 – Revised 30 March 2010 – Accepted 13 April 2010 – First published online 28 June 2010)

Dietary fibre is fermented by the human gut flora resulting mainly in the formation of SCFA, for example, acetate, propionate and butyrate. SCFA, in particular butyrate, may be important for secondary cancer prevention by inducing apoptosis and inhibiting cell growth of cancer cells, thereby inhibiting the promotion and/or progression of cancer. Furthermore, SCFA could also act on primary cancer prevention by activation of detoxifying and antioxidative enzymes. We investigated the effects of fermented wheat aleurone on the expression of genes involved in stress response and toxicity, activity of drug-metabolising enzymes and anti-genotoxic potential. Aleurone was digested and fermented *in vitro* to obtain samples that reflect the content of the colon. HT29 cells and colon epithelial stripes were incubated with the resulting fermentation supernatant fractions (fs) and effects on mRNA expression of *CAT*, *GSTP1* and *SULT2B1* and enzyme activity of glutathione *S*-transferase (GST) and catalase (CAT) were measured. Fermented aleurone was also used to study the protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in HT29 cells. The fs of aleurone significantly induced the mRNA expression of *CAT*, *GSTP1* and *SULT2B1* (HT29) and *GSTP1* (epithelial stripes), respectively. The enzyme activities of GST (HT29) and CAT (HT29, epithelial stripes) were also unambiguously increased (1.4- to 3.7-fold) by the fs of aleurone. DNA damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was significantly reduced by the fs of aleurone after 48 h, whereupon no difference was observed compared with the faeces control. In conclusion, fermented aleurone is able to act on primary prevention by inducing mRNA expression and the activity of enzymes involved in detoxification of carcinogens and antioxidative defence.

**Catalase: Fermented aleurone: Glutathione *S*-transferases: Human colon cells: Sulfotransferases**

Dietary fibre is considered to be a key component in the health benefits of fruits, vegetables and whole-grain cereals. Cereal grains contain high amounts of dietary fibre and other physiologically beneficial substances, for example, minerals, vitamins and phenolic acids. In wheat grains, the bran fraction, or more precisely the aleurone layer which forms the outer part of the endosperm, is rich in these substances<sup>(1)</sup>. The consumption of dietary fibre may have protective effects on the colon by elevating faecal volume and enhancing defecation, thereby reducing the exposure of colonocytes to cancer risk factors contained in the faeces. In addition, protection may be also a result of the bacterial fermentation of dietary fibre by the formation of SCFA, namely acetate, propionate and butyrate<sup>(2)</sup>.

Butyrate, in particular, has received much attention as a potential cancer-preventive agent, because of its ability to induce apoptosis and differentiation as well as to inhibit proliferation of transformed cells<sup>(3,4)</sup>. Additionally, butyrate could contribute to risk reduction, for example, by enhancing expression of glutathione *S*-transferases (GST) and other enzymes that are involved in detoxification processes<sup>(3)</sup>. Under physiological conditions, butyrate affects human

colon cells not separately but rather in conjunction with other fermentation products, which are formed simultaneously by microbial degradation of dietary fibre. Detailed evidence is limited on how fermentation products from dietary fibre sources such as grains interact with human intestinal cells and how these affect cells in comparison with analogous SCFA concentrations or butyrate alone<sup>(5,6)</sup>.

Cancer chemoprevention is characterised by the use of natural or synthetic substances to prevent the development of invasive cancer<sup>(7)</sup>. One mechanism of chemoprevention could involve protection against genotoxic compounds at the initiation and progression stage of colon carcinogenesis. Agents involved in the so-called primary prevention thus impede cancer-inducing compounds from reaching or reacting with specific target sites, for example, by preventing the formation of ultimate carcinogens or reactive oxygen species (ROS)<sup>(8)</sup>. Experimental evidence supports an important role for ROS in the pathogenesis of cancer in rodents and human subjects<sup>(9)</sup>. ROS such as superoxide (O<sub>2</sub><sup>•</sup>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroxyl radicals (OH<sup>•</sup>) are highly reactive oxidants that are formed during cell metabolism, signal transduction, or indirectly by various types of toxins. An imbalance between

**Abbreviations:** CAT, catalase; fs, fermentation supernatant fraction; GST, glutathione *S*-transferase; qPCR, quantitative PCR; RIN, RNA integrity number; ROS, reactive oxygen species; SULT, sulfotransferase.

\* **Corresponding author:** Dr Katrin Stein, fax +49 3641 949672, email stein.katrin@googlemail.com

the formation of ROS and the antioxidative defence system results in oxidative stress. This can cause damage to lipids, proteins and/or DNA. Therefore, an increase in ROS in the cell contributes to numerous degenerative diseases, including the initiation and promotion/progression stages of carcinogenesis<sup>(10–13)</sup>.

For protection against oxidative stress the cells express different types of stress-response enzyme systems, including GST, peroxidases and catalase (CAT). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is rapidly detoxified by CAT, which is the key defence system against oxidative stress. Therefore, a high level of expression or activity could be associated with less genetic damage and thereby reduce colorectal cancer risk<sup>(12,14–16)</sup>. Furthermore, GST and sulfotransferases (SULT) are phase II enzymes which can detoxify a number of carcinogens by conjugation of diverse electrophiles with glutathione or a sulfate group, respectively, and thus prevent these metabolites from binding to and damaging DNA<sup>(17)</sup>. It has been proposed that an enhancement of their activity might result in more efficient elimination of carcinogens and therefore reduce the susceptibility to cancer<sup>(15,18,19)</sup>.

The aim of the present study was to examine whether the expression of genes involved in stress response and toxicity can be modulated by complex fermentation supernatant fractions (fs) of aleurone obtained from different wheat varieties. The fs were generated using an *in vitro* batch model<sup>(20)</sup>. This model simulates the physiological conditions in the human intestine and provides an experimental approach to investigate the interactions of the resulting fermentation products, for example, SCFA, with the colon cells. Another aim was to investigate the functional consequences of an increased expression of the respective genes. We thus determined the enzyme activities of CAT and GST in HT29 cells incubated with the complex fs. Additionally, we compared the effects of the fs with those of butyrate and with a SCFA mixture prepared according to the fermentation samples. As mentioned above, GST and CAT are connected with inactivation of cancer risk factors, for example, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hence, it was of interest if the complex fs exhibit an increased detoxifying potential towards H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Furthermore, an important aim of the study was to examine whether genes and enzyme activities involved in detoxification can also be elevated in non-transformed human colon cells. In addition, we compared the effects in both human colon cell types, which were used in the present study. The results of our experiments were expected to enhance our knowledge about processes that are involved in the detoxification of potential genotoxic and carcinogenic agents.

## Methods and materials

### Dietary fibre source

Both varieties (European and American) of wheat aleurone were provided from Kampffmeyer Food Innovation GmbH (Hamburg, Germany). Preparation of the aleurone fraction (ASP-2 preparation with high purity) was done by Bühler AG (Uzwil, Switzerland) according to Böhm *et al.*<sup>(21)</sup>. To maintain stability of the aleurone fractions, samples were prepared and stored in air- and light-proof flasks at 4°C.

### In vitro digestion and fermentation of wheat aleurone

Wheat aleurone (European and American) was digested and fermented *in vitro* according to the described procedures of Aura *et al.*<sup>(22)</sup> and Glei *et al.*<sup>(5)</sup> with some modifications<sup>(20)</sup>. The whole procedure was done in six repetitions using a batch-culture system. Briefly, for simulation of the whole digestive tract, samples were weighed (0.5 g fermentable sample), mixed thoroughly with 10 ml PBS (0.1 M; pH 7.0), and 0.85 % (w/v) saline solution (6.25 ml) was added to the samples. A sample without wheat aleurone was used (blank; faeces control) as a control. All incubation steps were performed at 37°C in a shaking water-bath under the same conditions. Salivary α-amylase (Sigma A-0521; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) diluted to 1000 U/ml with 20 mM-sodium phosphate buffer was added (17.36 U/sample), and the samples were incubated for 5 min. HCl solution (150 mM; 2.81 ml) was added to lower the pH to 2.0. Pepsin (Sigma P-7012; 1.11 mg) dissolved in 0.94 ml of 20 mM-HCl solution per sample or blank was added and the mixture was incubated for 2 h. An intestinal extract was produced by dissolving 3 mg ox gall (Fluka-Sigma 70 168) and 2.6 mg pancreatin (Sigma P-1750) in 5 ml sodium bicarbonate buffer (11 mM; pH 6.5). The intestinal extract was added to each sample or blank, the pH was adjusted to 6.5 using NaOH solution (10 M) and the suspension (25 ml) was filled into a dialysis tube (4596-1, molecular weight cut-off 1000 Da; Roth, Karlsruhe, Germany). The tubes were placed into glass bottles filled with 2 litres dialysis buffer (13.61 g potassium phosphate and 1.88 g sodium bicarbonate dissolved in distilled water; pH 6.5) and incubated for 6 h at 37°C under semi-anaerobic conditions. Semi-anaerobic conditions in the glass bottles were achieved by removing a part of the air with an injected cannula (0.5 bar for 1 min). Subsequently, the bottles were filled with a fermentation gas mixture (86 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> and 4 % H<sub>2</sub>) via the cannula (0.8 bar for 1 min). After 15 min (seven cycles repeated), the cannulae were removed. At the end of the incubation, the suspension was transferred from the dialysis tube into a 500 ml glass bottle and the pH was measured for each sample.

The *in vitro* fermentation was performed as described by Glei *et al.*<sup>(5)</sup> with slight modifications. At least three human donors provided faeces for the preparation of the faecal inoculums. All fermentations were conducted under anaerobic conditions at 37°C for 24 h (thirteen or fourteen cycles of removing the air and filling with the fermentation gas mixture). The fermentation process was stopped by placing the suspensions on ice and the pH was measured. Each sample was transferred to 50 ml tubes and centrifuged (4200 g; 4°C) for 30 min. The supernatant fractions were transferred into new 50 ml tubes and centrifuged again (4200 g; 4°C) for 15 min and stored at –80°C. Before sterilisation of the fs, the samples were thawed quickly, sampled in 2 ml tubes and centrifuged (16 000 g; 4°C). Afterwards, the fs were sterilised by filtration (pore size 0.22 µm) to obtain the final fs for use in the cell-culture experiments and chemical analysis. The chemical analyses of the sterile fs were done by using HPLC–MS/MS and GC–MS and the results have been published before in Borowicki *et al.*<sup>(20)</sup>. Moreover, before incubation of the respective colon cells the sterilised fs were diluted with cell-culture medium to reach a final concentration of 5, 10 or 20 % (v/v) fs.

### *Preparation of the synthetic mixtures*

The synthetic SCFA mixtures (of the fs of blank and aleurone) were prepared based on the concentrations determined by GC-MS<sup>(20)</sup>. These mixtures thus mimic the exact concentrations of acetate, propionate and butyrate found in the different fs. The use of these samples in cell-culture experiments can help to identify the role of the respective SCFA in the biological effects of the fs. The same dilutions of the synthetic mixtures as the fs (10 %) were used in the cell-culture experiments.

The different SCFA were dissolved in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL, Eggenstein, Germany) supplemented with 10 % fetal calf serum. Sodium butyrate (Chemical Abstracts Service (CAS) no. 156-54-7) and sodium acetate (CAS no. 127-09-3) were obtained from Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Germany). Sodium propionate (CAS no. 137-40-6) was from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). All chemicals were of the highest commercially available grade of purity.

### *Cell culture*

The culture conditions of human colon adenocarcinoma cell line HT29 (American Type Culture Collection (ATCC) no. HTB-38) were previously described in Glei *et al.*<sup>(23)</sup>. Passages 6–24 were used for the experiments. At regular intervals a mycoplasma test (MycAlert™ Detection Kit; Lonza AG, Köln, Germany) was performed and contamination with mycoplasma was excluded.

### *Isolation and cultivation of human epithelial stripes*

Colon epithelial stripes were isolated from tissue specimens obtained during surgery of colorectal tumours, diverticulitis and colon polyps. The tissues were taken from the very edges of the resected colon segments. After histological examination the surgeon confirmed that they did not show any micro- or macroscopic signs of malignant or inflammatory pathology. The university ethics committee approved the study and patients gave their informed consent (approval no. 1601-08/05). The mean age of the six donors whose colon epithelial stripes were used for cytosol preparation was 65 (SD 11) years. Of the donors, three were male. For gene expression analysis only five donors (three male, two female) could be used because of degradation of one sample during cDNA synthesis. The tissue was prepared by separating the colon epithelium from the underlying layers of the tissue according to a described procedure of Schaeferhenrich *et al.*<sup>(24)</sup>. Resulting epithelial stripes were used for incubation and subsequent analysis of gene expression and enzyme activities. Tissue stripes were used because they displayed an improved survival after incubation in comparison with single cells in suspension.

### *Treatment of colon epithelial stripes for analysis of gene expression and enzyme activity*

Effects on gene expression and enzyme activity in epithelial stripes were studied after incubating the tissue

stripes with 10 and 20 % (subtoxic concentrations diluted in medium) fs of the blank and fs of European aleurone for 10 h. Because of the small size of the available samples, only the fs of European aleurone could be examined. Therefore, epithelial tissue stripes were placed in Petri dishes (35 mm<sup>2</sup>) and, after allowing the tissue pieces to settle for 15 min, they were treated with the fs dissolved in minimal essential medium (MEM) with Earle's salts enriched with 20 % fetal calf serum, 2 mM-glutamine, 1 % penicillin/streptomycin, gentamicin (100 µg/ml), fungizone (2.5 µg/ml), epidermal growth factor (10 ng/ml), insulin (5 µg/ml), transferrin (5 µg/ml) and sodium selenite (5 ng/ml)<sup>(25)</sup>. After 10 h, epithelial stripes were washed and immediately submerged in RNAlater RNA stabilisation reagent (Qiagen, Hilden, Germany) or they were ground in liquid N<sub>2</sub> for enzyme activity measurement. The epithelial stripes were stored at –80°C until further use for total RNA isolation and cytosole extraction.

### *Treatment of HT29 cells for analysis of gene expression, enzymic activity and anti-genotoxicity*

HT29 cells were grown in T<sub>25</sub> cell-culture flasks (3 × 10<sup>6</sup> cells per flask) for gene expression analysis using custom array or real-time PCR and in six-well plates (1.5 × 10<sup>6</sup> cells per well) for analysis of enzyme activity and anti-genotoxic capacity for 24 h. Thereafter they were treated with 10 % fs of aleurone (European and American) for 24 h (gene expression) or 24–72 h (enzyme activity), respectively, and with 5 and 10 % of fermented aleurone for 24–48 h (anti-genotoxicity). In addition, for the analyses of enzyme activities, HT29 cells were also incubated with the corresponding synthetic SCFA mixture of each complex fs or butyrate alone. Moreover, a positive control (4 mM-butyrate) was used for gene expression analysis (real-time PCR only). After incubation, the HT29 cells were trypsinised and suspended in PBS. Viability and cell number were determined with a CASY-cell counter (CASY® model TT; Roche Innovatis AG CASY® Technology, Bielefeld, Germany). Subsequently, the cells were used for investigations on mRNA expression, enzyme activity and anti-genotoxicity.

### *Isolation of RNA*

To isolate total RNA, epithelial stripes stored in RNAlater solution were thawed and transferred into RLT (lysis) buffer. Subsequently, the cell pellets were homogenised in the presence of RLT buffer using the Polytron PT-DA 2107/2EC Homogenizer (Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Germany). HT29 cells stored in RLT buffer were thawed and lysed using QIAshredder mini spin columns.

Thereafter, total RNA was isolated using the RNeasy Plus Mini Kit according to the manufacturer's manual (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA (dissolved in 50 µl RNase-free water) was stored at –80°C. Yield and purity of RNA were determined with the NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab, Erlangen, Germany) and RNA quality (RNA integrity number; RIN) was measured using the Bioanalyzer (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Germany).



### *mRNA expression analysis using custom array*

To analyse a broad range of genes involved in mechanisms of carcinogenesis and chemoprevention, a custom-designed cDNA microarray was used for HT29 cells.

For this, equal amounts of RNA (1 µg; RIN 8.5–10) were used for synthesising first-strand cDNA with Superscript II RT (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). A second-strand cDNA was synthesised afterwards using Polymerase I, RNaseH and *Escherichia coli* DNA ligase (Invitrogen GmbH). After clean-up of the product, the double-stranded cDNA was used to synthesise cRNA by *in vitro* transcription in order to increase the amount of template used for cDNA labelling with Cy3- and Cy5-dCTPs (GE Healthcare, Braunschweig, Germany). The reaction product was purified to obtain clean, labelled and single-stranded cDNA which was hybridised with a customised cDNA array (PIQOR; Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) containing 300 genes which are involved in colon cancer and six housekeeping genes as described previously<sup>(26)</sup>. Before this, the glass slide arrays were preheated and prehybridised. The final hybridisation step was carried out overnight in a humidified hybridisation chamber at 65°C. After this, the custom arrays were washed and dried before scanning and measuring fluorescence intensity which was done by Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Germany). LOESS (locally weighted scatterplot smoothing)-corrected raw data were normalised to the housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). Data are presented as fold change compared with the medium control which was set to 1 for each experiment.

### *mRNA expression analysis of CAT, GST, MAF2 and SULT2B1 using real-time PCR*

For the analysis of gene expression, 1 µg (epithelial stripes) or 2.5 µg (HT29 cells) of total RNA (RIN: epithelial stripes, 7–10; HT29, 9–10) were converted into first-strand cDNA using SuperScript II (Invitrogen GmbH) and an oligo(dT)<sub>12–18</sub> primer. Real-time quantitative PCR (qPCR) was carried out using specific primer pairs and qPCR Eva Green Master (Jena Bioscience, Jena, Germany). All reactions were performed in duplicate. The PCR reaction profile included an initial denaturation of 2 min at 95°C, followed by forty cycles of denaturation (15 s at 95°C), annealing and extension (30 s at 60°C). Cumulative fluorescence was measured at the end of the extension of each cycle. Product-specific amplification was confirmed by melting curve analysis. The following gene-specific primer sequences were used for the quantification: *CAT* (forward 5'-TGGACAAGTACAATGCTGAG-3' and reverse 5'-TTACACGG ATGAACGCTAA G-3'); *GAPDH* (forward 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3' and reverse 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'); *GSTP1* (forward 5'-CTGCGCATGCTGCTGGCAGAT C-3' and reverse 5'-TTGGACTGGTACAGGGTGAGGTC-3'); *MAF2* (forward 5'-AAATACGA GAAGTTGGTGAGCAG-3' and reverse 5'-ACACTGGTAAGTACACGATGCTG-3'); *SULT2B1* (forward, 5'-ACGACGACATCTTTAT-CATCAC-3' and reverse, 5'-CATGTAGATCACCTTGGC CT-3'). All primers were designed using the freely available PerlPrimer software v1.1.17 (<http://perlprimer.sourceforge.net>). Gene expression of

target genes was calculated on the basis of the housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) according to Pfaffl *et al.*<sup>(27)</sup>. Changes of expression were determined as the fold change compared with the medium control which was set to 1.

### *Preparation of cell lysates and measurement of enzyme activities*

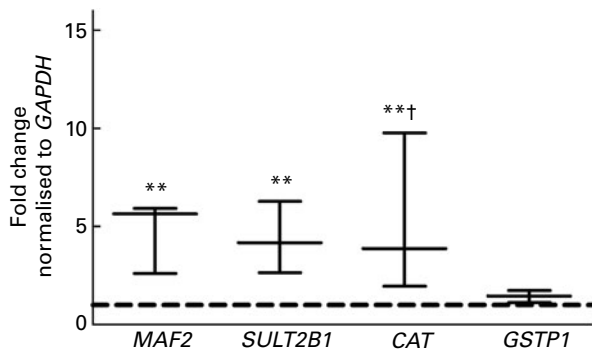
Briefly, after harvesting and washing, cytosols of HT29 cells were extracted by incubation in a lysis buffer containing 1 mM-EDTA, 0.1 % Triton X-100, 50 mM-potassium phosphate buffer (pH 6.5) and 1 mM-pefabloc (Roth, Karlsruhe, Germany) for 10 min on ice. Epithelial stripes were thawed and homogenised before cytosol extraction in the presence of the lysis buffer using a Polytron PT-DA 2107/2EC Homogenizer (Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Germany). Cells were subsequently incubated for 10 min on ice. After centrifugation (10 000 g; 10 min; 4°C), the supernatant fractions were sampled and subsequently used for enzyme activity measurements. CAT activity was calculated according to Aebi *et al.* using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate<sup>(28)</sup>. The decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was photometrically measured at 240 nm and 22°C. Total GST activity was determined photometrically as described in Habig *et al.*<sup>(29)</sup> using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate. The increase of the *S*-2,4-dinitrophenylglutathione, the product of conjugated CDNB, was measured at 340 nm and 30°C using a photometer. Results were calculated on the basis of 1 × 10<sup>6</sup> cells for HT29 cells and expressed as fold change compared with the medium control which was set to 1. Opposed to this, enzyme activities of epithelial stripes were calculated on the basis of 1 µg protein because tissue stripes were incubated and thus the determination of cell number was not possible. Afterwards, the results were expressed as fold change compared with the medium control which was set to 1. Total protein content was measured using the method of Bradford with bovine serum albumin as the standard protein<sup>(30)</sup>.

### *Detection of anti-genotoxicity*

DNA damage was measured with the single cell micro gel electrophoresis (comet assay) after challenging the fs of aleurone pre-incubated cells with 75 µM-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 min at 37°C as has been described elsewhere<sup>(31)</sup>. Comet images, revealing the amount of damaged DNA (intensity of fluorescence in the comet tail; % tail intensity)<sup>(32)</sup>, were quantified using the image analysis system of Perceptive Instruments (Halstead, Essex, UK). For each concentration, means of sixty cells were the basis for calculating the effects in one experiment.

### *Statistical evaluation*

Mean values and standard deviations were calculated from at least three independent experiments (HT29 cells) and five or six donors (colon epithelial stripes), respectively. Differences were calculated by one- or two-way ANOVA, including the Bonferroni post test with selected pairs, or by Student's *t* test using GraphPad Prism (version 5.02 for Windows; GraphPad



**Fig. 1.** Gene expression analysis using customised cDNA array in HT29 cells after treatment with 10% of the fermentation supernatant fraction (fs) of European aleurone for 24 h. *GAPDH*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *MAF2*, transcription factor MAF (proto-oncogene C-MAF); *SULT2B1*, sulfotransferase family cytosolic 2B member 1; *CAT*, catalase; *GSTP1*, glutathione S-transferase pi 1. Data are expressed as box and whisker plots (median values and variations;  $n$  3). Mean value was significantly different from that of the medium control (set to 1; ---): \*\*  $P < 0.05$  (Student's  $t$  test). Mean value was different from that of the fs of the blank (data not shown): †  $P < 0.10$  (trend; Student's  $t$  test).

Software, San Diego, CA, USA). The statistical analyses used depended on the respective experimental design and are specified in the legends to the figures and table footnotes.

## Results

### Effects of fermented aleurone on mRNA expression in HT29 cells

To analyse the effects of the fs of European aleurone on the expression of a broad range of genes a custom array was used. The results indicated that the expression of ten genes was significantly ( $P < 0.05$ ;  $t$  test) up-regulated on the basis of the evaluation criteria ( $\leq 0.6$ ,  $\geq 1.5$ ) after treatment with 10% fs of European aleurone for 24 h. No gene was significantly down-regulated. The regulated genes are involved in phase II and phase III metabolism as well as stress response and signal transduction and cell-cycle regulation. Of the significantly modulated genes (Fig. 1), three, namely *CAT*, *MAF2* and *SULT2B1*, which were of special interest for primary prevention, were verified by real-time PCR.

In addition, the mRNA expression of *GSTP1*, which was induced 1.4 (SD 0.3) fold in comparison with the medium control, was measured. Although its induction was not significant, *GSTP1* was of special interest because it is the main GST isoform in the colon. The fs of the blank showed no modulation of mRNA expression (data not shown).

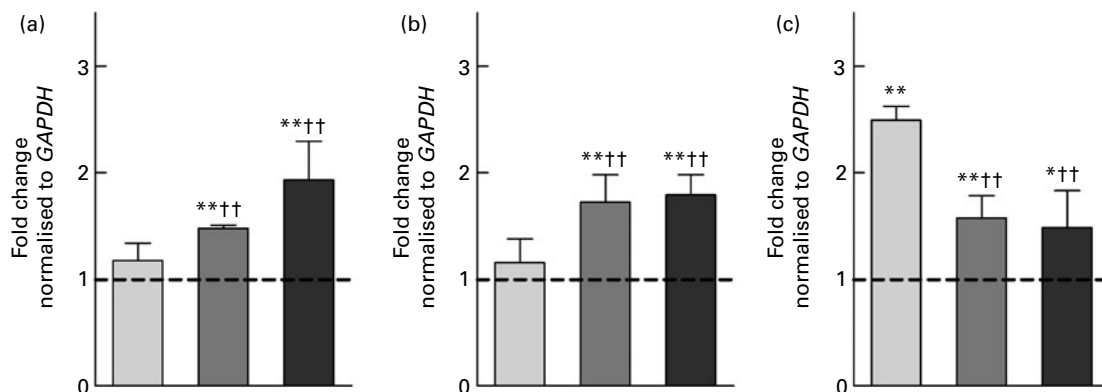
### Confirmatory experiments using real-time quantitative PCR in HT29 cells

The induction of the selected genes (*CAT*, *GSTP1*, *MAF2* and *SULT2B1*) after the incubation with 10% fs of aleurone (European and American) was evaluated by real-time qPCR. The directional changes in mRNA expression levels in response to the fs of European aleurone after 24 h were confirmed except for *MAF2* for which no functional primer pair could be established. In addition, American aleurone, which was not investigated in the custom array analysis, showed a comparable modulation. The regulation by both fs of aleurone after 24 h is displayed in Fig. 2. Thus, expression levels of all three genes were significantly increased, with a fold change of over 1.5 in comparison with the medium control. Moreover, the up-regulation of *CAT* and *GSTP1* by both fs of aleurone was significantly different from the faeces control (fs of blank; sample without test substance). Interestingly, for *SULT2B1* the expression was induced by the fs of the blank on a significantly higher level than by the fs of aleurone.

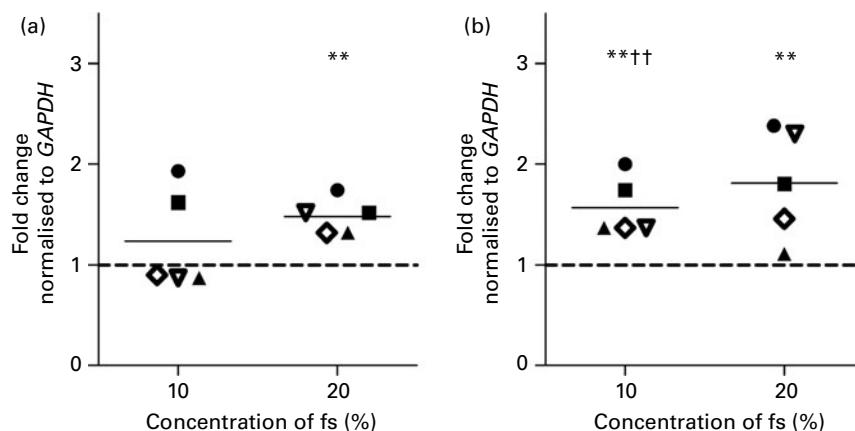
### Gene expression analysis of *CAT* and *GSTP1* in colon epithelial stripes with real-time quantitative PCR

To analyse if aleurone can also increase the expression of genes involved in primary chemoprevention in healthy colon cells and thus prevent the initiation of cancer, we used colon epithelial stripes isolated from human colon surgeries. The mRNA expression of selected genes involved in pathways of antioxidative defence (*CAT*) and detoxification of carcinogens (*GSTP1*) was investigated using real-time qPCR.

In comparison with HT29 cells, in epithelial stripes only the mRNA expression of *GSTP1* was significantly induced by the fs of aleurone (10%, 1.6 (SD 0.3) fold; 20%, 1.8 (SD 0.5) fold) (Fig. 3) whereupon the up-regulation by 10% fs of aleurone was more effective than the respective fs of the blank.



**Fig. 2.** Gene expression analysis of catalase (*CAT*) (a), glutathione S-transferase pi 1 (*GSTP1*) (b) and sulfotransferase family cytosolic 2B member 1 (*SULT2B1*) (c) using real-time quantitative PCR in HT29 cells after incubation with 10% of the fermentation supernatant fraction (fs) of the faeces control (blank) (□), the European (■) and the American aleurone (■) after 24 h. Values are means ( $n$  3), with standard deviations represented by vertical bars. Mean value was different from that of the medium control (set to 1; ---): \*  $P < 0.10$  (trend), \*\*  $P < 0.05$  (Student's  $t$  test). Mean value was significantly different from that of the fs of the blank: ††  $P < 0.05$  (Student's  $t$  test).



**Fig. 3.** Gene expression analysis of glutathione S-transferase pi 1 (*GSTP1*) using real-time quantitative PCR in human colon epithelial stripes after incubation with 10 and 20% of the fermentation supernatant fraction (fs) of the faeces control (blank) (a) and the European aleurone (b) for 10 h. Results are normalised based on glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), calculated compared with the medium control (set to 1; ---) and expressed as fold change. Shown are the means of five donors (—) and the variability of response of each donor. The same symbols represent the response in one donor. Mean value was significantly different from that of the medium control: \*\*  $P<0.05$  (Student's *t* test). Mean value was significantly different from that of the fs of the blank: ††  $P<0.05$  (Student's *t* test).

Moreover, the fs of the blank altered the mRNA expression at a concentration of 20% (1.5 (SD 0.2) fold). For *CAT* no modulation of the mRNA expression level was seen (data not shown).

#### Quantification of total glutathione S-transferase activity

To verify whether the observed changes in gene expression would have an effect on the functional level, GST activity, a marker of cancer chemoprevention, was measured in HT29 and human colon epithelial stripes. Therefore, HT29 cells were incubated with 10% fs of aleurone (European and American), the corresponding synthetic SCFA mixture and butyrate for 24, 48 and 72 h while the epithelial stripes were incubated with 10 and 20% of the fs of aleurone (European) for 10 h. In HT29 cells the GST activity was significantly enhanced by fermented American aleurone after an incubation time of 48 h whereas a non-significant trend for the induction by European aleurone was observed ( $P=0.08$ ; *t* test). The longer incubation time (72 h) with the fs of European and American aleurone did not result in higher levels of GST activity (data not shown) so that only effects after 48 h are illustrated in Table 1 (relative GST activity column). Only the fs of American aleurone differed from the fs of the blank, after 48 h by trend ( $P<0.07$ ) and after 72 h on a significant level even though no differences in induction of enzyme activity were seen for both varieties. Enzyme activity was not affected by the fs of the blank in comparison with the medium control. The synthetic mixture (SCFA) of the complex fs of American aleurone and butyrate also induced GST activity after 48 h in HT29 cells in a comparable manner, but on a significantly lower level than the fs.

In epithelial stripes GST enzyme activity was significantly increased by both 10% fs of the blank and fs of aleurone on a low level (Fig. 4). Furthermore, the fs of the blank and fs of aleurone showed a comparable activity.

#### Quantification of catalase activity

As a further marker for cancer prevention, *CAT* activity was determined in HT29 and epithelial stripes using the different

test substances. The quantification revealed that *CAT* activity was induced in HT29 cells in response to the incubation with the fs of the blank, fs of aleurone as well as the corresponding synthetic mixtures and butyrate. Already, after 24 h the fs of European aleurone significantly modulated *CAT* activity in comparison with the medium control. This effect became more pronounced over time, so that after 72 h the enzyme activity was 2.7 (SD 0.68) fold increased. The inducing effect could also be seen for American aleurone which became significant after the incubation for 48 and 72 h, being strongest after 72 h (3.3 (SD 1.76) fold). Since the effects were strongest after incubation for 72 h, data are only illustrated for this time point in Table 1 (relative *CAT* activity column). Differences from the fs of the blank were significant

**Table 1.** Glutathione S-transferase (GST) activity after 48 h and catalase (*CAT*) activity after 72 h treatment of HT29 cells with the fermentation supernatant fractions (fs) and their identical synthetic SCFA mixtures and butyrate§

(Mean values and standard deviations; *n* 4)

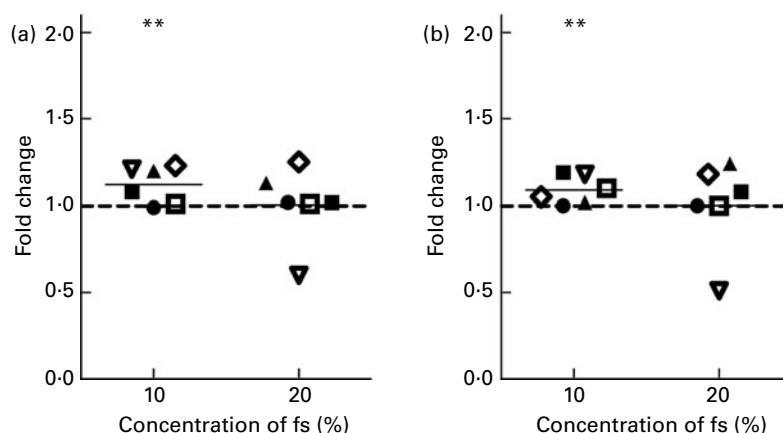
	Relative GST activity (fold change)		Relative <i>CAT</i> activity (fold change)	
	Mean	SD	Mean	SD
fs of blank	1.3	0.6	1.4	0.7
SCFA	1.1	0.2	1.0	0.1
Butyrate	1.2	0.2	1.0	0.2
fs of European aleurone	2.2*	1.0	2.6**††	0.6
SCFA	1.1	0.3	1.5**††	0.3
Butyrate	1.2	0.2	1.3	0.3
fs of American aleurone	2.2**††	0.5	3.7**†	1.7
SCFA	1.3**††	0.1	1.4**†	0.1
Butyrate	1.5**†	0.3	1.5**†	0.3

Mean value was different from that of the medium control (set to 1): \*  $P<0.10$  (trend), \*\*  $P<0.05$  (Student's *t* test).

Mean value was different from that of the fs of the blank: †  $P<0.10$  (trend), ††  $P<0.05$  (Student's *t* test).

Mean value was different from that of the respective fs: ‡  $P<0.10$  (trend), ‡‡  $P<0.05$  (Student's *t* test).

§ Results are calculated compared with the medium control and expressed as fold change.



**Fig. 4.** Enzyme activity of glutathione *S*-transferase in human colon epithelial stripes after incubation with 10 and 20% of the fermentation supernatant fraction (fs) of the faeces control (blank) (a) and the European aleurone (b) for 10 h. Results are calculated compared with the medium control (set to 1; ---) and expressed as fold change. Shown are the means of six donors (—) and the variability of response of each donor. The same symbols represent the response in one donor. Mean value was significantly different from that of the medium control: \*\*  $P < 0.05$  (Student's *t* test).

for the fs of European aleurone and showed a trend for the fs of American aleurone only after 72 h. Enzyme activity was not affected by the fs of the blank in comparison with the medium control after 72 h. Particularly after 72 h, the corresponding synthetic mixtures (SCFA) of fermented aleurone (European and American) induced CAT activity even though at a lower level than the fs. Moreover, butyrate alone also enhanced enzyme activity and did not vary from the synthetic SCFA mixture. In epithelial stripes CAT enzyme activity was significantly increased by 10% fs of aleurone (1.4 (SD 0.4) fold) after 10 h even though the effect was not significantly different from the fs of the blank, which also stimulated enzyme activity on a significant level (Fig. 5).

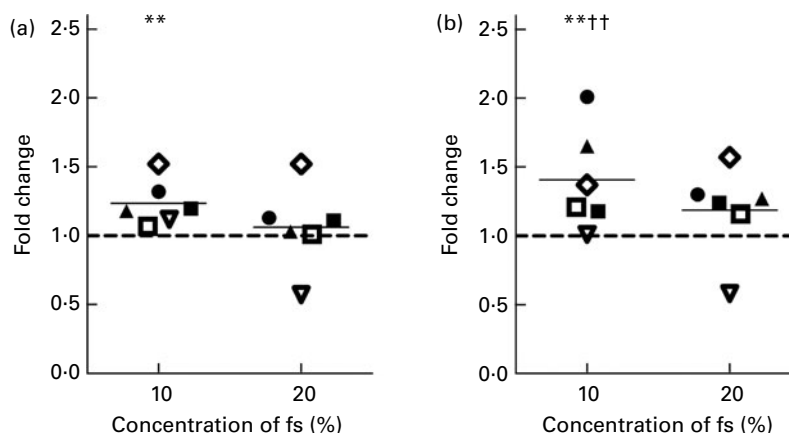
#### Anti-genotoxicity

To analyse whether treatment with fermented aleurone caused an improved protection against oxidative stress, HT29 cells were pre-incubated for 24 and 48 h with the test compounds and afterwards they were challenged with  $H_2O_2$ . No cytotoxic

impact of either substance was detected at the applied concentration and time. Treatment with the fermented aleurone (European and American) resulted in significantly reduced levels of  $H_2O_2$ -induced DNA damage after 48 h (Fig. 6). However, DNA damage was also reduced at a comparable level by the fs of the blank. After 24 h pre-incubation DNA damage was not affected by the fs of European and American aleurone. No DNA damage was detected in medium-incubated control cells or cells incubated with the fs of aleurone (European and American) and the fs of the blank, demonstrating that these samples had no genotoxic effects (data not shown).

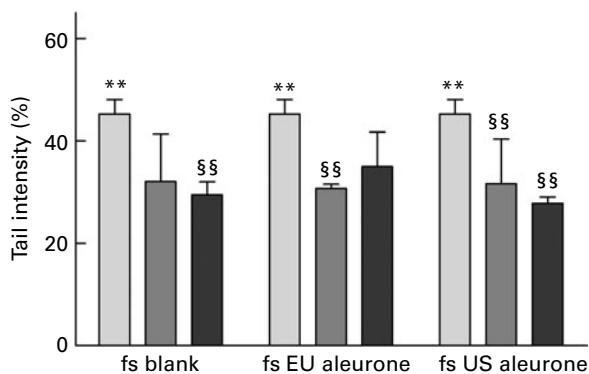
#### Discussion

It has been proposed that dietary habits and lifestyle strongly affect the development of colorectal cancer<sup>(33)</sup>. However, it is still a matter of debate whether dietary fibre actually plays an important role in colon cancer prevention<sup>(34–36)</sup>.



**Fig. 5.** Enzyme activity of catalase in human colon epithelial stripes after incubation with 10 and 20% of the fermentation supernatant fraction (fs) of the faeces control (blank) (a) and the European aleurone (b) for 10 h. Results are calculated compared with the medium control (set to 1; ---) and expressed as fold change. Shown are the means of six donors (—) and the variability of response of each donor. The same symbols represent the response in one donor. Mean value was significantly different from that of the medium control: \*\*  $P < 0.05$  (Student's *t* test). Mean value was significantly different from that of the fs of the blank: ††  $P < 0.05$  (Student's *t* test).





**Fig. 6.** Modulation of  $H_2O_2$ -induced DNA damage by pre-treatment with 0 (□), 5 (■) and 10% (■) fermentation supernatant fractions (fs) of faeces control (blank), European (EU) aleurone and American (US) aleurone for 48 h in HT29 cells. Values are means ( $n$  3), with standard deviations represented by vertical bars. Mean value was significantly different from that of the medium control: \*\*  $P < 0.05$  (Student's  $t$  test), §§  $P < 0.05$  (one-way ANOVA with Bonferroni post test).

The involvement of complex fs and their contained fermentation products, especially of butyrate, on markers of primary prevention was until today rarely the subject of *in vitro* studies. The custom array results of the present study showed a significant induction of genes involved in the mechanisms of detoxification of xenobiotics and drugs<sup>(37,38)</sup>, for example, *GSTP1* and *SULT2B1*, and their regulatory pathways, for example, *MAF2*, as well as in the stress response, for example, *CAT* by fermented European aleurone where *CAT* was the most strongly affected gene (5.19 (SD 4.07) fold). Thus, a better protection of cells from DNA damage, risk of mutations and, possibly, promotion and progression of carcinogenesis can be suggested<sup>(39)</sup>. Although, the induction of *GSTP1* mRNA expression, the major GST in the human colon epithelium<sup>(40)</sup>, was only visible as a trend, we detected a clear induction by real-time qPCR investigations.

Phase II enzymes are regulated by the transcription factor Nrf2. In response to oxidative stress, Nrf2 dissociates from its cytosolic inhibitor Keap1, translocates to the nucleus, forms a heterodimer with other bZIP transcription factors such as MAF2 (c-maf)<sup>(41)</sup> and binds to the antioxidative response elements (ARE) in the promoters of target genes. This leads to the activation of the transcription of several defence genes such as *GSTP1* and *CAT*<sup>(42,43)</sup>. We measured an enhanced expression of *MAF2* of about 4.73 (SD 1.84) fold after an incubation with 10% fs of European aleurone which may cause the higher expression of *GSTP1* and *CAT*<sup>(26,44)</sup>. However, much more in-depth studies are necessary to elucidate the underlying mechanisms in the regulation of *GSTP1* and *CAT* mRNA expression by fermented aleurone.

The custom array results were confirmed using real-time qPCR in HT29 cells. The expressions of *CAT*, *GSTP1* and *SULT2B1* were significantly increased ( $\geq 1.5$  fold) by the fs of the European and American aleurone in a comparable manner, whereas the faeces control had no effect on the mRNA expression of *CAT* and *GSTP1*.

To analyse whether the fermentation samples can also protect healthy colon cells from carcinogens, we used human colon epithelial stripes. Here we found an induction of *CAT* mRNA expression by 20% fs of aleurone (1.5 (SD 0.6) fold). Studies of Sauer *et al.*<sup>(15)</sup>, who showed an

induced mRNA expression of *CAT* (1.6 (SD 0.6) fold) by 10 mM-butyrate, support this finding. However, the concentration of butyrate was about 5-fold lower in the fs and thus synergistic effects of butyrate with other unknown fermentation metabolites may increase the efficacy of the fs. It has to be kept in mind that epithelial stripes are isolated from human colon surgeries and therefore cells from different donors may react differently. This is supported by our findings showing that the *CAT* mRNA was expressed with a high inter-individual variability in human colon epithelial stripes, which points to large differences in cellular susceptibility to xenobiotics between the donors. In addition, an induction of the *GSTP1* mRNA expression by the fs (10 and 20%), but also by the fs of the blank, was observed in the epithelial stripes, pointing to yet unidentified factors in the faecal matrix that may be responsible<sup>(45)</sup>. A study of Treptow-van Lishaut *et al.* also demonstrated an enhanced *GSTP1* mRNA expression in the colon of rats after feeding a diet rich in resistant starch<sup>(46)</sup>. Pool-Zobel *et al.*<sup>(47)</sup> showed an induction of several GST after butyrate treatment of human colon epithelial stripes, premalignant human LT97 adenoma and malignant human HT29 cancer cells. In this context, it was discussed that on one hand, an induction of GST is favourable since it results in an enhanced detoxification of risk factors in primary cells. On the other hand, in tumour cells the induction could increase resistance to chemotherapeutic agents. However, it may be speculated that the high concentration of butyrate (10–20 mM) *in vivo* could impair tumour cell growth before GST induction can occur<sup>(47)</sup>. Nevertheless, the HT29 cell line has often been applied to investigate cancer-preventive effects of food constituents as a well-established cell model for human colon cells<sup>(20,23,48–50)</sup> owing to the lack of manageable culture methods for primary cells.

Both the fs of European and American aleurone showed a significant induction of *SULT2B1* mRNA expression (European, 1.6 (SD 0.2) fold; American, 1.5 (SD 0.3) fold). This effect was, however, also observed for the fs of the blank (2.5 (SD 0.1) fold). Saini *et al.* reported that cytosolic SULT-mediated sulfation plays an essential role in the detoxification of bile acids<sup>(51)</sup>. Thus, higher concentrations of toxic bile acids in the fs of the blank (cholic acid (CA),<sup>(20)</sup> 0.35  $\mu$ M; deoxycholic acid (DCA), 46.65  $\mu$ M) than in the fs of aleurone (European: CA, 0.20  $\mu$ M, DCA, 5.04  $\mu$ M; American: CA, 0.23  $\mu$ M, DCA, 5.93  $\mu$ M) could possibly explain the slightly higher induction of *SULT2B1* expression by the fs of the blank. We were not able to examine mRNA expression of *SULT2B1* in epithelial stripes because of the small size and the limited availability of the colon surgery samples.

Measurements of enzyme activities as a possible consequence of increased mRNA expression showed an enhanced *CAT* and *GST* activity by 10% fs of aleurone (European and American) after 48 and 72 h, respectively, in HT29 cells. Our investigations allow comparison of enzyme activity induction caused by the complex fs, synthetic SCFA mixture as well as butyrate alone in HT29 cells. Only the SCFA mixture and butyrate of the fs American aleurone, but not of European aleurone, were capable of inducing *GST* activity but on a lower level than the complex fs. An induction of *GST* activity by 4 mM-butyrate has been previously demonstrated in human colon cancer cells<sup>(49,52)</sup>. In another study the induced *GST* activity by complex fs of arabinoxylans



could be mainly attributed to the butyrate content<sup>(5)</sup>. Since the SCFA mixture and butyrate showed comparable effects, butyrate seems to be mainly responsible for the effects observed in the present study. However, the results indicate that interactions with other metabolites in the fs are obviously important. The so-called 'added value' of secondary plant compounds such as antioxidant and anti-mutagenic phenolic acids<sup>(53)</sup> in wheat aleurone could be the reason for the higher enzyme activity measured by the complex fs compared with the single fermentation product butyrate. The lack of induction of GST activity by the SCFA mixture and butyrate of the fs of European aleurone could be due to a lower butyrate concentration than in the fs of American aleurone (European, 2.0 mM; American, 2.4 mM).

In human epithelial stripes the GST activity was significantly increased on a low level by the fs of aleurone, but also by the fs of the blank. Possibly a 10 h incubation was too short to detect unambiguous changes in protein expression levels. Therefore, an increase of the survival time of human epithelial stripes in culture, a major limitation of this interesting model of healthy colon cells, may be necessary to analyse effects on enzyme activities in detail. Efforts to improve models of healthy colon cells are therefore important to analyse effects of nutritional factors on markers of chemoprevention and a major focus of research of our and other groups. In addition, inhibitory substances in the faecal matrix could exist and influence GST activity, as was suggested by Beyer-Sehlmeyer *et al.*<sup>(6)</sup>.

To date, no data are available whether complex fs affect CAT activity *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, only relatively few data exist which describe an effect by butyrate treatment on CAT activity. Sauer *et al.* showed the induction of CAT activity by butyrate treatment (10 mM) in primary human colon cells<sup>(15)</sup>. In addition, studies of Yano & Tierney demonstrated a butyrate-induced increase in CAT activity in artery smooth muscle cells<sup>(54)</sup>. Our investigation demonstrates for the first time that the induction of CAT is caused by fs of aleurone in HT29 cells. The corresponding SCFA mixture and butyrate also increased the enzyme activity, but on a lower level than the complex fs which indicates that various compounds, in particular phenolic acids<sup>(55)</sup>, of the fs rather than a single component such as butyrate possibly contribute to the effects *in vitro*.

Furthermore, in human epithelial stripes an enhanced CAT enzyme activity by the fs of aleurone (10 %, but not 20 %) significantly different from the fs of the blank was also observed. The fact that mRNA levels of *CAT* are not modulated by the fs of aleurone possibly indicates that CAT activity can be the result of post-transcriptional modifications. The same was reported in investigations using primary colon cells by Sauer *et al.* who demonstrated an enhanced CAT activity after 2 h which was less apparent after 4 and 8 h while gene expression was increased after 12 h of butyrate treatment (10 mM)<sup>(15)</sup>. The fs of the blank (10 %) also altered CAT enzyme activity (1.4 (SD 0.4) fold) when compared with the medium control, again possibly explicable by unidentified bacterial products<sup>(45)</sup>. In addition, different susceptibilities of the donors again play a decisive role. While in some of the donors mRNA expression and/or enzyme activity (mainly donors 1, 2 and 4) was increased, in other donors no effects on these two parameters were observed.

The present study reports, as a further functional effect of the complex fermentation samples, that all fs and the fs of the blank prevent the formation of oxidative DNA damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*. In view of the fact that fermented aleurone had no additional effect compared with the faeces control, other so far unidentified metabolites resulting from the faecal inoculum might be responsible for the anti-genotoxic effect. Other studies that have compared the anti-genotoxic efficacy of fermentation samples also detected effects of the fs of the blank<sup>(5)</sup>. The mechanism by which the fermented samples reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in colon cells is still not clear. In the present study the reduced DNA damage could be possibly caused by the increased mRNA expression and enzyme activity of CAT and GST even though these parameters were not influenced by the faeces control. However, this anti-genotoxicity possibly arises from direct antioxidative activities and/or modification of DNA repair mechanisms<sup>(11,56)</sup>.

In conclusion, the present study demonstrates that fermentation products of wheat aleurone can increase mRNA expression of genes involved in detoxifying processes. This induction resulted in an enhanced activity of selected enzymes, namely GST and CAT. These enzymes play an important role in the protection against oxidative DNA damage. However, if HT29 cells are regarded as a model for colon cells in general, our investigations highlighted mechanisms which support an enhanced potential of detoxification of cancer risk factors that may influence the initiation and promotion of cancer. More importantly, we showed evidence that protection can also be increased in normal colon epithelial stripes from human surgeries which emphasises a possible role of wheat aleurone in cancer prevention. Since wheat aleurone showed similar biological effects in both human colon cells we may assume that the same underlying mechanisms probably prevail.

Hence, the modulation of markers of primary chemoprevention indicates that wheat aleurone may possibly have a cancer-preventive potential. Nevertheless, further studies using isolated human primary cells as well as animal studies and/or human intervention trials are required to define a role in primary cancer prevention by fermentation products of wheat aleurone under *in vivo* conditions.

## Acknowledgements

For funding we would like to thank the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF 0313829A).

We thank N. Wachter (Kampffmeyer Food Innovation GmbH, Hamburg, Germany) for providing the wheat aleurone and W. von Reding (Bühler AG, Uzwil, Switzerland) for preparation of the aleurone fraction from wholemeal wheat flour. We are grateful to H. Mothes (Hospital Friedrich-Schiller-University Jena, Germany) for providing the colon surgery samples. Furthermore, we thank all donors of colon tissue for giving their informed consent and supporting our studies. Finally, we gratefully acknowledge the excellent assistance by Ms Esther Woschke and Ms Anika Schettler.

K. S., A. B., D. S. and M. G. designed the research and wrote the paper. K. S. and A. B. performed the *in vitro*

fermentation and the experiments on gene expression. K. S. measured the enzyme activities and anti-genotoxicity.

The authors have no conflicts of interest.

## References

- Amrein TM, Gränicher P, Arrigoni E, *et al.* (2003) *In vitro* digestibility and colonic fermentability of aleurone isolated from wheat bran. *Lebensm WissTechnol* **36**, 451–460.
- Hughes SA, Shewry PR, Li L, *et al.* (2007) *In vitro* fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans. *J Agric Food Chem* **55**, 4589–4595.
- Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, *et al.* (2009) Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat Res* **682**, 39–53.
- Abrahamse SL, Pool-Zobel BL & Rechkemmer G (1999) Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis* **20**, 629–634.
- Glei M, Hofmann T, Kuster K, *et al.* (2006) Both wheat (*Triticum aestivum*) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect human colon cells from genotoxic activities of 4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide. *J Agric Food Chem* **54**, 2088–2095.
- Beyer-Schlmeyer G, Glei M, Hartmann E, *et al.* (2003) Butyrate is only one of several growth inhibitors produced during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre sources. *Br J Nutr* **90**, 1057–1070.
- Das D, Arber N & Jankowski JA (2007) Chemoprevention of colorectal cancer. *Digestion* **76**, 51–67.
- Wattenberg LW (1993) Prevention–therapy–basic science and the resolution of the cancer problem. *Cancer Res* **53**, 5890–5896.
- Deshpande SS & Irani K (2002) Oxidant signalling in carcinogenesis: a commentary. *Hum Exp Toxicol* **21**, 63–64.
- Hamer HM, Jonkers DM, Bast A, *et al.* (2009) Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clin Nutr* **28**, 88–93.
- Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, *et al.* (2001) Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* **22**, 1675–1680.
- Matés JM, Pérez-Gómez C & Núñez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* **32**, 595–603.
- Gupta A, Butts B, Kwei KA, *et al.* (2001) Attenuation of catalase activity in the malignant phenotype plays a functional role in an *in vitro* model for tumor progression. *Cancer Lett* **173**, 115–125.
- Klaunig JE & Kamendulis LM (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 239–267.
- Sauer J, Richter KK & Pool-Zobel BL (2007) Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J Nutr Biochem* **18**, 736–745.
- Pool-Zobel BL, Abrahamse SL, Collins AR, *et al.* (1999) Analysis of DNA strand breaks, oxidized bases, and glutathione S-transferase P1 in human colon cells from biopsies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**, 609–614.
- Cotterchio M, Boucher BA, Manno M, *et al.* (2008) Red meat intake, doneness, polymorphisms in genes that encode carcinogen-metabolizing enzymes, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**, 3098–3107.
- Hoensch H, Peters WH, Roelofs HM, *et al.* (2006) Expression of the glutathione enzyme system of human colon mucosa by localisation, gender and age. *Curr Med Res Opin* **22**, 1075–1083.
- Bowman KG & Bertozzi CR (1999) Carbohydrate sulfotransferases: mediators of extracellular communication. *Chem Biol* **6**, R9–R22.
- Borowicki A, Stein K, Scharlau D, *et al.* (2010) Fermented wheat aleurone inhibits growth and induces apoptosis in human HT29 colon adenocarcinoma cells. *Br J Nutr* **103**, 360–369.
- Bohm A, Bogoni C & Behrens R, *et al.* (2002) Method for the extraction of aleurone from bran. International patent WO 02/15711 A2. Uzwil, Switzerland: Bühler AG.
- Aura AM, Härkönen H, Fabritius M, *et al.* (1999) Development of an *in vitro* enzymatic digestion method for removal of starch and protein and assessment of its performance using rye and wheat breads. *J Cereal Sci* **29**, 139–152.
- Glei M, Kirmse A, Habermann N, *et al.* (2006) Bread enriched with green coffee extract has chemoprotective and antigenotoxic activities in human cells. *Nutr Cancer* **56**, 182–192.
- Schaeferhenrich A, Sendt W, Scheele J, *et al.* (2003) Putative colon cancer risk factors damage global DNA and TP53 in primary human colon cells isolated from surgical samples. *Food Chem Toxicol* **41**, 655–664.
- Rogler G, Daig R, Aschenbrenner E, *et al.* (1998) Establishment of long-term primary cultures of human small and large intestinal epithelial cells. *Lab Invest* **78**, 889–890.
- Veeriah S, Miene C, Habermann N, *et al.* (2008) Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells. *Int J Cancer* **122**, 2647–2655.
- Pfaffl MW, Horgan GW & Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, e36.
- Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* **105**, 121–126.
- Habig WH, Pabst MJ & Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**, 7130–7139.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Glei M, Matuschek M, Steiner C, *et al.* (2003) Initial *in vitro* toxicity testing of functional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells. *Toxicol In Vitro* **17**, 723–729.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, *et al.* (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175**, 184–191.
- World Cancer Research Fund & American Institute for Cancer Research (2007) *Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington, DC: AIRC.
- Bingham SA, Day NE, Luben R, *et al.* (2003) Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* **361**, 1496–1501.
- Schatzkin A, Freedman LS, Lanza E, *et al.* (1995) Diet and colorectal cancer: still an open question. *J Natl Cancer Inst* **87**, 1733–1735.
- Schatzkin A, Lanza E, Corle D, *et al.* (2000) Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *N Engl J Med* **342**, 1149–1155.

37. Clapper ML & Szarka CE (1998) Glutathione *S*-transferases – biomarkers of cancer risk and chemopreventive response. *Chem Biol Interact* **111–112**, 377–388.
38. Mattes WB, Daniels KK, Summan M, *et al.* (2006) Tissue and species distribution of the glutathione pathway transcriptome. *Xenobiotica* **36**, 1081–1121.
39. Matés JM (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **153**, 83–104.
40. Pool-Zobel B, Veeriah S & Bohmer FD (2005) Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens – focus on glutathione *S*-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutat Res* **591**, 74–92.
41. Kwak MK, Wakabayashi N & Kensler TW (2004) Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat Res* **555**, 133–148.
42. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, *et al.* (2009) Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **46**, 443–453.
43. Chan K, Han XD & Kan YW (2001) An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4611–4616.
44. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, *et al.* (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 313–322.
45. Roberfroid MB (2005) Introducing inulin-type fructans. *Br J Nutr* **93**, Suppl. 1, S13–S25.
46. Treptow-van Lishaut S, Rechkemmer G, Rowland I, *et al.* (1999) The carbohydrate crystalline and colonic microflora modulate expression of glutathione *S*-transferase subunits in colon of rats. *Eur J Nutr* **38**, 76–83.
47. Pool-Zobel BL, Selvaraju V, Sauer J, *et al.* (2005) Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione *S*-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* **26**, 1064–1076.
48. Kautenburger T, Beyer-Sehlmeyer G, Festag G, *et al.* (2005) The gut fermentation product butyrate, a chemopreventive agent, suppresses glutathione *S*-transferase theta (hGSTT1) and cell growth more in human colon adenoma (LT97) than tumor (HT29) cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **131**, 692–700.
49. Ebert MN, Beyer-Sehlmeyer G, Liegibel UM, *et al.* (2001) Butyrate induces glutathione *S*-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal. *Nutr Cancer* **41**, 156–164.
50. Fenton JI & Hord NG (2006) Stage matters: choosing relevant model systems to address hypotheses in diet and cancer chemoprevention research. *Carcinogenesis* **27**, 893–902.
51. Saini SP, Sonoda J, Xu L, *et al.* (2004) A novel constitutive androstane receptor-mediated and CYP3A-independent pathway of bile acid detoxification. *Mol Pharmacol* **65**, 292–300.
52. Ebert MN, Klinder A, Peters WH, *et al.* (2003) Expression of glutathione *S*-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate. *Carcinogenesis* **24**, 1637–1644.
53. Ferguson LR & Harris PJ (2003) The dietary fibre debate: more food for thought. *Lancet* **361**, 1487–1488.
54. Yano S & Tierney DF (1989) Butyrate increases catalase activity and protects rat pulmonary artery smooth muscle cells against hyperoxia. *Biochem Biophys Res Commun* **164**, 1143–1148.
55. Clifford MN (2000) Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric* **80**, 1033–1043.
56. Sandström BE & Marklund SL (1990) Effects of variation in glutathione peroxidase activity on DNA damage and cell survival in human cells exposed to hydrogen peroxide and *t*-butyl hydroperoxide. *Biochem J* **271**, 17–23.

### 3.3 Publikation III: Effects of synbiotic fermentation products on primary chemoprevention in human colon cells.

Katrin Stein, Anke Borowicki, Daniel Scharlau, Anika Schettler, Kerstin Scheu, Ursula Obst, Michael Glei. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2011. Verfügbar seit 15.08.2011.

Die Darmflora beeinflusst maßgebend die Gesundheit des menschlichen Organismus. Sie ist in zahlreichen Mechanismen involviert, die z. B. auf das Immunsystem und auf die Ätiologie von Dickdarmkrebs Einfluss nehmen. Eine Veränderung der Intestinalflora durch die Aufnahme von Pro- und Präbiotika hin zu positiv wirkenden Darmbakterien könnte somit die Darmgesundheit unterstützen. In dieser Studie wurde untersucht, ob die Kofermentation von Weizenaleuron und den Probiotika LGG<sup>®</sup>/Bb12 die Genexpression von Enzymsystemen involviert in Entgiftungsprozessen sowie damit verbundenen funktionellen Konsequenzen (Enzymaktivitäten, Antigenotoxizität) in gesunden (Primärzellen) und bereits entarteten (HT29) humanen Kolonzellen beeinflusst. Der FÜ des Weizenaleurons zeigte antikanzerogene Effekte, indem er die mRNA-Expression von *SULT2B1* und *Katalase* in HT29 und *GSTP1* in beiden Zelltypen erhöhte. Eine Aktivitätserhöhung der GST und Katalase war in HT29 zu beobachten. Eine Verringerung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Schäden in HT29 war möglicherweise auf die gesteigerten Enzymaktivitäten zurückzuführen. Hierbei konnte ein zusätzlicher Nutzen der zugegebenen Probiotika beobachtet werden. Durch diese Veränderungen könnten Zellen vor Schädigungen durch Kanzerogene und/oder reaktiven Sauerstoffspezies geschützt werden, was die Initiation/Promotion des Transformationsprozesses möglicherweise verhindert. Somit könnte die Aufnahme von Lebensmitteln angereichert mit Aleuron und Probiotika förderlich auf die Darmgesundheit des Menschen wirken.

#### Eigenanteil:

- Anteilige Durchführung der *in vitro* Fermentation
- Isolierung und Aufarbeitung der Kolongewebeproben
- Anteilige Durchführung der RNA-Isolation und der *real-time* qPCR
- Bestimmung der Enzymaktivitäten (Katalase, GST) und anteilige Bestimmung der Antigenotoxizität
- Auswertung, Interpretation und Darstellung der Ergebnisse
- Verfassung des Manuskriptes



## Effects of synbiotic fermentation products on primary chemoprevention in human colon cells<sup>☆</sup>

Katrin Stein<sup>a,\*</sup>, Anke Borowicki<sup>a</sup>, Daniel Scharlau<sup>a</sup>, Anika Schettler<sup>a</sup>, Kerstin Scheu<sup>b</sup>,  
Ursula Obst<sup>b</sup>, Michael Gleis<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Nutritional Toxicology, Institute for Nutrition, Biological-Pharmaceutical Faculty, Friedrich-Schiller-University Jena, 07743 Jena, Germany

<sup>b</sup>Department of Microbiology of Natural and Technical Interfaces, Institute of Functional Interfaces (IFG), Research Center Karlsruhe, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

Received 31 May 2010; received in revised form 28 February 2011; accepted 30 March 2011

### Abstract

The consumption of synbiotics, a mixture of probiotics and indigestible food constituents such as dietary fiber, has been reported to reduce colon cancer risk. We investigated the effects of fermented wheat aleurone enriched with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG/*Bifidobacterium animalis* supsp. *lactis* on the gene expression and functional end points related to cellular defence in HT29 and primary human colon cells. Aleurone was digested and fermented *in vitro* with/without probiotics. The resulting fermentation supernatants (fs) were analyzed for concentrations of deoxycholic acid and ammonia. The cells were treated with the fs, and effects on gene expression of catalase, *GSTP1* and *SULT2B1*, enzyme activity of catalase and glutathione S-transferase as well as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage were examined. Fermentation of aleurone reduced deoxycholic acid concentration by 84%, while the probiotics enhanced this effect. Ammonia was increased by fs aleurone, whereas a reduction occurred by the addition of *L. rhamnosus* GG/*B. animalis* supsp. *lactis* 12. *GSTP1* expression tended to result in an increase by the fs aleurone in both cell types, whereas the probiotics could not additionally increase the effect. Catalase was not modulated by fs aleurone enriched with probiotics. Only in HT29 cells, expression of *SULT2B1* was enhanced by fs aleurone. Enzyme activity of catalase and glutathione S-transferase was induced (2–3.6 fold, 72 h) in HT29 cells only. Addition of probiotics had no influence on this effect. In HT29 cells, a reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage by the fs aleurone after 48 h, enhanced by the addition of probiotics, was detected. The observed effects could improve detoxification of xenobiotics and therefore may lower colon cancer risk.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Wheat aleurone; Catalase; Glutathione S-transferases; Human colon cells; Probiotics; Sulfotransferases

### 1. Introduction

Colorectal cancer is one of the most common causes of death from cancer worldwide. Approximately one million people are diagnosed with colon cancer every year, over the last 25 years [1]. It is suggested that diet and other lifestyle factors are substantially involved in cancer development [2,29].

The intestinal microflora acts as an important determinant for general health of the human body, for example, by influencing the immune system and the aetiology of colon cancer. Therefore, a beneficial modulation of the composition of the gut microbiota represents an interesting approach to improve health. This modulation can be realized either by ingestion of probiotics, living microbial

feed supplements, which improve the intestinal microbial balance; or prebiotics, which are selectively fermented ingredients that allow specific changes, both in the composition and/or activity in the gastrointestinal microflora that confer benefits upon host well-being and health [3–5]. Meanwhile, there is some evidence indicating an inverse association of probiotic intake and the incidence of colon cancer [6]. Even though the mechanisms by which probiotics may inhibit colon cancer are not fully characterized, some potential mechanisms were disclosed, for example, alteration of the metabolic activities of the intestinal microflora, changing physicochemical conditions in the colon, binding of potential carcinogens, short-chain fatty acid (SCFA) production and production of antitumorigenic or antimutagenic compounds [7,8].

Dietary fiber represents a substrate for fermentation by the human gut flora and has been shown to convey a prebiotic effect, which has been linked to colon cancer prevention [3]. Consequently, the fermentation results in a selective stimulation of growth and/or activity of the gut microflora, particularly the beneficial *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* [9,10]. However, fermentation of dietary fiber also results in the formation of SCFA, namely, acetate, propionate and butyrate. Of these, butyrate, in particular, has received much attention

**Abbreviations:** CAT, catalase; DCA, deoxycholic acid; GST, glutathione S-transferases; fs, fermentation supernatant; SCFA, short-chain fatty acids; SULT, sulfotransferases.

<sup>☆</sup> The work was supported by the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF 0313829A).

\* Corresponding author. Tel.: + 49 3641 949675.

E-mail address: [stein.katrin@googlemail.com](mailto:stein.katrin@googlemail.com) (K. Stein).



as a potential chemopreventive agent [11,12]. While acting as energy source for nontransformed cells, butyrate possibly reduces survival of tumor cells by inducing apoptosis and differentiation as well as inhibiting proliferation. These mechanisms may play an important role in the reduction and/or inhibition of promotion and progression of cancer development [13,14].

Many prebiotics belong to the group of nondigestible oligosaccharides, which resist digestion and absorption in the human small intestine and are fermented in the colon [4]. Fructo-oligosaccharides and inulin are the best-studied prebiotic oligosaccharides. The main complex nondigestible polysaccharide of cereal grains is the dietary fiber arabinoxylan, which is an important part of the aleurone layer of whole grains, for which a prebiotic potential was suggested [4,15]. Rafter et al. demonstrated by a human intervention trial that synbiotic products, a combination of pro- and prebiotics, are more effective than probiotics or prebiotics alone in terms of cancer prevention [16].

Next to influencing cell survival of cancer cells, another mechanism by which prebiotics and dietary fiber may be protective against colon cancer is by preventing the formation of ultimate carcinogens or reactive oxygen species (ROS) [12].

Experimental evidence supports an important role for ROS in carcinogenesis. ROS are highly reactive oxidants, which are formed during numerous physiological processes, for example, aerobic respiration, cell metabolism, detoxification of foreign compounds and immune response [17]. Oxidative stress, the imbalance between the formation and degradation of ROS, can cause damage of lipids, proteins and/or DNA, thereby contributing to numerous degenerative diseases, including the initiation and promotion/progression of cancer [18–21].

Mammalian cells express different types of protective stress-response enzyme systems against oxidative stress, for example, catalase (CAT) or superoxide dismutase. Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), a highly reactive ROS, is rapidly detoxified by CAT, the key defence enzyme against oxidative stress. A high level of CAT expression and/or activity is therefore associated with a reduction of genetic damage and consequently a lower risk for cancer [20,22–25].

Glutathione S-transferases (GST) and sulfotransferases (SULTs) are phase II enzymes that can detoxify a number of carcinogens by conjugation of diverse electrophiles with glutathione or a sulfate group, respectively. It has been proposed that an enhancement of GST and SULT activity might result in more efficient elimination of carcinogens and therefore reduces the susceptibility to cancer [26,27].

In this study, the colon adenocarcinoma cell line HT29 was used as a well-established and stable cell model for human colon cells, which has been used in many other studies [28–31]. Primary human colon cells were used to investigate the effects on primary chemoprevention.

Up to now, the effects of complex fermentation supernatants (fs) containing probiotics on primary chemoprevention have rarely been the subject of *in vitro* studies. Thus, the first aim of the study was to find out whether expression of genes involved in primary cancer prevention can be changed by complex fs of wheat aleurone generated with an *in vitro* batch model [31]. Another aim was to determine whether a combined administration of aleurone and *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) and *Bifidobacterium animalis* supsp. *lactis* (Bb12) during fermentation would increase the potency of chemoprotective effects of the fs. Furthermore, the content of potential tumor-promoting metabolites [deoxycholic acid (DCA) and ammonia] in the fs was determined. To examine the functional consequences of a modulated messenger RNA (mRNA) expression of the selected genes involved in detoxification, the enzyme activities of CAT and GST were analyzed in both colon cell models. As mentioned above, GST and CAT are connected with inactivation of cancer risk factors, for example,  $H_2O_2$  [20,24]. Hence, it was of interest if the complex fs exhibit an increased chemoprotective potential toward  $H_2O_2$ .

## 2. Methods and materials

### 2.1. Dietary fiber source and probiotics

Wheat aleurone from Kampffmeyer Food Innovation GmbH (Hamburg, Germany) was used as a source of dietary fiber. Preparation of the aleurone fraction (we used an aleurone standard preparation [ASP-2] with high purity [70]) was done by Bühler AG (Uzwil, Switzerland) according to Böhm et al. [32]. To maintain stability of the aleurone, aliquots were prepared and stored in air- and light-proof flasks at 4°C. To analyze synergistic effects, we used a mixture of two probiotic strains – LGG and Bb12. LGG from Valio (Helsinki, Finland) and Bb12 from Christian Hansen (Hørsholm, Denmark) were both available as lyophilized highly viable powders (>log10 colony-forming unit/g product).

### 2.2. *In vitro* digestion and fermentation of wheat aleurone

This experiment was conducted by using wheat aleurone with (aleurone+) or without addition of the probiotic strains LGG/Bb12 (each  $3 \times 10^9$  colony-forming unit) (aleurone–) as substrates. The test substances were digested and fermented *in vitro* in two repetitions in a batch-culture system according to the described procedure of Borowicki et al. [31]. Samples without the dietary fiber source but with (blank+) or without (blank–), the probiotic strains were used as controls. The obtained fs were stored at –80°C. Before using in the cell culture experiments, the samples were thawed quickly, aliquoted in 2-ml tubes, centrifuged ( $16,000 \times g$ , 4°C) and sterilized by filtration (pore size, 0.22  $\mu m$ ).

### 2.3. Analytics of potential tumor-promoting metabolites in fs

The concentrations of DCA and ammonia in the fs were determined by HPLC-MS/MS (high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry) and colorimetrically by the Berthelot reaction, respectively, as described elsewhere [31].

### 2.4. Preparation of primary human colon cells

Primary human colon cells were isolated from tissue specimens obtained during surgery of colorectal tumors, diverticulitis and colon polyps. The tissues were taken from the very edges of the resected colon segments. The surgeon and the pathologist confirmed that they did not show any micro- or macroscopic signs of malignant or inflammatory pathology. The university ethics committee approved the study, and the patients gave their informed consent (approval number: 1601-08/05). Mean age ( $\pm$ S.D.) of the six donors (three male, three female) of colon tissue, whose cells were used in the form of epithelial stripes for RNA isolation and cytosol extraction after incubation with the test substances, was 65 (S.D., 11) years. The tissue was prepared by separating the colon epithelium from the underlying layers of the tissue according to a described procedure of Schäferhenrich et al. [33]. The obtained epithelial stripes were used for incubation and subsequent analysis of gene expression and enzyme activities. To use noncytotoxic concentrations of the test substances in investigations on gene expression and enzyme activity, cell number and viability of the primary human colon cells had to be determined after incubation with the test substances. For this, single cells were isolated from the epithelial stripes of three male and three female patients [mean (S.D.) age, 79 (4) years] using proteinase K (Sigma, Steinheim, Germany) and collagenase C (Roche, Penzberg, Germany) as described before [33].

### 2.5. Cell culture of HT29 cells

The human colon adenocarcinoma cell line HT29 was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany), and culture conditions used are described in Glei et al. [28]. Passages 9–18 were used for the experiments. In regular intervals (~once a month), a mycoplasma test (MycoAlert Detection Kit) was performed, and contamination with mycoplasma was excluded.

### 2.6. Determination of cell number and viability of primary colon cells

Single cells ( $2.8 \times 10^6$  cells/ml), isolated from epithelial stripes, were incubated for 1–12 h with 0–20% fs aleurone– and fs aleurone+ and the corresponding fs blank (feces control) diluted in minimal essential medium with Earle's salts enriched with 20% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 100  $\mu g$ /ml gentamicin, 2.5  $\mu g$ /ml Fungizone, 10 ng/ml epidermal growth factor, 5  $\mu g$ /ml insulin, 5  $\mu g$ /ml transferrin and 5 ng/ml sodium selenite [34] in a shaking thermomixer at 37°C. The trypan blue exclusion test was routinely used according to Strober [35] to determine cell number and cell viability after incubating the cells to exclude cytotoxic effects of fs for the following experiments.

### 2.7. Treatment of primary colon cells to analyze gene expression and enzyme activity

Effects of fermented aleurone with and without LGG/Bb12 on gene expression and enzyme activity were studied after incubating epithelial tissue stripes with 10% (subtoxic concentrations) of the fs. This was done because cells incubated as epithelial stripes displayed an improved survival after 10 h of incubation in comparison with

single cells in suspension. Therefore, primary colon tissue pieces were placed in Petri dishes (35 mm<sup>2</sup>), and after allowing the tissue pieces to settle for 15 min, they were treated with the fs dissolved in minimal essential medium. After 10 h, epithelial stripes were washed and immediately submerged in RNeasy lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany), or they were ground in liquid nitrogen for experiments on enzyme activity. Storage of the samples took place at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use for total RNA isolation and cytosol extraction.

## 2.8. Treatment of HT29 cells to analyze gene expression, enzymatic activity and antigenotoxicity

HT29 cells were grown for 24 h in T<sub>25</sub>-cell culture flasks ( $3 \times 10^6$  cells per flask) to analyze mRNA expression by real-time quantitative polymerase chain reaction (real time qPCR) or in 6-well plates ( $1.5 \times 10^6$  cells/well) to analyze enzyme activity and antigenotoxic capacity. Then they were treated with 10% fs aleurone± for 24 h for analysis of gene expression, for 24–72 h for analysis of enzyme activity or for 24–48 h for analysis of the antigenotoxic potential of the fs against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage, respectively. After harvesting the cells with trypsin and a washing step, the pellets were used immediately to extract cytosols or to determine the antigenotoxicity. Onto analysis of mRNA expression, the cell pellets were stored in RLT buffer (for lysis of cells before RNA isolation; Qiagen) at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use for total RNA isolation. Cell number and viability were determined with a CASY cell counter (CASY model TT; Roche Innovatis AG CASY Technology, Bielefeld, Germany).

## 2.9. Isolation of RNA

To isolate total RNA, epithelial stripes stored in RNeasy lysis buffer were thawed, transferred into RLT buffer (for lysis of cells before RNA isolation) and were subsequently homogenized using the Polytron PT-DA 2107/2EC homogenizer (Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Germany). HT29 cells stored in RLT buffer were thawed and completely lysed using Qiasphere minispins columns. Afterward, total RNA was isolated using the RNeasy plus Mini Kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen), dissolved in RNase-free water and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use. Yield and purity of RNA were quantified with a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab, Erlangen, Germany), and RNA stability (RNA integrity number) was measured using a Bioanalyzer (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Germany).

## 2.10. Gene expression analysis of CAT, GST and SULT2B1 using real-time qPCR

To analyze mRNA expression, 1 µg (primary colon cells) or 2.5 µg (HT29 cells) of total RNA (RNA integrity numbers 7–10) was converted into first-strand complement DNA using SuperScript II as described in the manufacturer's protocol (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). For real-time qPCR analysis, we used the system of iCycler iQ1 (Bio-Rad GmbH, München, Germany). Real-time qPCR was carried out using specific primer pairs and qPCR Eva Green Master according to the manufacturer's protocol (Jena Bioscience, Jena, Germany). All reactions were performed in duplicate. The PCR reaction profile included an initial denaturation of 2 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , followed by 40 cycles of denaturation (15 s at  $95^{\circ}\text{C}$ ), annealing and extension (30 s at  $60^{\circ}\text{C}$ ). Cumulative fluorescence was measured at the end of the extension of each cycle. Product-specific amplification was confirmed by melting curve analysis, which was conducted with temperature gradient from  $60^{\circ}\text{C}$  to  $95^{\circ}\text{C}$  at  $0.1^{\circ}\text{C}/\text{s}$  to differentiate nonspecific primer dimer and specific amplicon. Gene-specific primer sequences for quantification of CAT (forward 5'-TGGACAAG-TACAATGCTGAG-3' and reverse 5'-TTACACGGATGAACGTAAG-3'), GAPDH (forward 5'-ACCCACTCTCCACCTTTGAC-3' and reverse 5'-TCCACCACCTGTGCTGAC-3'), GSTP1 (forward 5'-CTGCGCATGCTGCTGCCAGATC-3' and reverse 5'-TTGACTGGTACAGGTGAGGTC-3') and SULT2B1 (forward, 5'-ACGACGACATCTTTATCATCAC-3' and reverse, 5'-CATGTAGATCACCCTGGCCT-3') were used in both cell types, whereas only CAT and GSTP1 were used for primary human colon cells because of the small size of the available samples. All primers were designed using the freely available PerlPrimer software version 1.1.17 (<http://perlprimer.sourceforge.net>).

The iCycler iQ1 optical version 3.0a software was utilized for determining the relative threshold cycle numbers ( $C_t$ ).

The relative quantification of the target-mRNA expression was calculated with the comparative  $\Delta\Delta C_t$  ( $\Delta C_t = \Delta C_t \text{ control} - \Delta C_t \text{ reference}$ ) method. For normalization,  $\Delta C_t$  values were calculated by subtracting the average of the  $C_t$  value in the control for the reference gene (GAPDH) from the average of the  $C_t$  value for the target gene and subtracting the average of the  $C_t$  value in the treated sample of the reference gene from the target gene. Then, the difference between the  $\Delta C_t$  values of control and treatment ( $\Delta\Delta C_t$ ) was calculated. The fold change was ascertained according to the efficiency method ( $E=2$ ; fold change =  $2^{\Delta\Delta C_t}$ ) [36,37].

Changes of expression were determined as the fold change to the medium control, which was set to 1.

## 2.11. Preparation of cytosols, measurement of enzyme activities and cytosolic protein

To analyze the enzyme activity of CAT and GST, HT29 cells were lysed by incubation in a cold lysis buffer containing 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50 mM potassium

phosphate buffer (pH 6.5) and 1 mM pefabloc (Roth, Karlsruhe, Germany) for 10 min on ice. Epithelial stripes were thawed and homogenized before cytosol extraction in the presence of the lysis buffer using the Polytron PT-DA 2107/2EC homogenizer (Fisher Scientific GmbH). Cells were subsequently incubated for 10 min on ice. After centrifugation ( $10,000 \times g$ , 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), the supernatants for both primary colon as well as HT29 cells were aliquoted and subsequently used for enzyme activity measurements. CAT activity was calculated according to Aebi [38] using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate by photometrically measuring its decrease at 240 nm and  $22^{\circ}\text{C}$ . Total GST activity was determined photometrically as described in Habig et al. [39] using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene as substrate. The increase of S-2,4-dinitrophenylglutathion, the product of conjugated 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, was photometrically measured at 340 nm and  $30^{\circ}\text{C}$ . Results for HT29 cells were calculated on the basis of  $1 \times 10^6$  cells and expressed as fold change to the medium control, which was set to 1. Results for primary colon cells were calculated on the basis of 1 µg protein and expressed as fold change to the medium control, which was set to 1. Total protein content was measured using the method of Bradford [40] with bovine serum albumin as standard protein.

## 2.12. Detection of antigenotoxicity

DNA damage was measured with the single-cell microgel electrophoresis (Comet assay) after challenging the fs blank± as well as the fs aleurone± preincubated HT29 cells with 75 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 min at  $37^{\circ}\text{C}$  according to the described procedure of Gleit et al. [41]. Comet images, revealing the amount of damaged DNA (intensity of fluorescence in the comet tail; % tail intensity = TI) [42], were quantified using the image analysis system of Perceptice Instruments (Halstead, UK). For each concentration, means of 60 cells were the basis for calculating effects in one experiment.

## 2.13. Statistical evaluation

Means and standard deviations (S.D.) were calculated from at least three independent experiments (HT29 cells) and six donors (colon epithelial stripes), respectively. Differences were calculated by one- or two-way analysis of variance (ANOVA), including Bonferroni posttest with selected pairs, by Student's *t* test or by Friedman test, including Dunn's posttest with selected pairs using GraphPad Prism Version 5.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The statistical analyses used depended on the respective experimental design and are specified in the legends to the figures and tables.

# 3. Results

## 3.1. Potential tumor-promoting metabolites in fs

The concentrations of the secondary bile acid DCA and ammonia were determined in the fs blank± and fs aleurone± (Table 1). Fermentation of aleurone— resulted in a considerable decrease in the amount of the secondary bile acid DCA by 84% compared with the fs blank—. The probiotics alone (fs blank+) also decreased the DCA concentration by 76% in comparison with the fs blank—. Importantly, the combination of both aleurone and LGG/Bb12 (fs aleurone+) showed the strongest decreasing effect with an almost completely reduction (of about 99.5%).

The level of ammonia was higher in the fs aleurone— than in the fs blank—. The probiotics alone (fs blank+) decreased the level of ammonia about 20% from 16.33 mM in the fs blank— to 12.96 mM. The addition of the probiotics to aleurone (fs aleurone+) also resulted in a reduction of ammonia in the fs in comparison with fs aleurone—.

## 3.2. Cell number and viability of primary colon cells

Cell number and viability of primary colon cells were determined by the trypan blue exclusion test after treatment of single cells with 0–20% of fs blank± and fs aleurone± to examine cytotoxicity. Only after 12 h, the viability of the untreated primary colon cells decreased significantly by 47% (S.D., 6%), and the recovery (remaining cells after incubation) of the cells was significantly reduced to 11% (S.D., 4%). However, an incubation for up to 12 h with all selected concentrations (0, 2.5%, 5%, 10% and 20%) of our fs caused no impairment of the cell viabilities and the recovered number of cells in comparison with the control (data not shown). Thus, related to those two parameters, no dose effects were seen within each test substance. Therefore, a

concentration of 10% fs (analog to HT29 cells) was selected for subsequent experiments, because effects on mRNA expression and enzyme activities were supposed to be determined using a non-cytotoxic concentration. Accordingly, the cell viabilities of 10% fs [blank–: 59% (S.D., 4%); blank+: 63% (S.D., 10%); aleurone–: 61% (S.D., 11%); aleurone+: 62% (S.D., 9%)] did not differ significantly from the medium control [53% (S.D., 6%)] after the longest incubation time.

### 3.3. Gene expression analysis of CAT, GSTP1 and SULT2B1 by real-time qPCR

The influence of the fs blank± and fs aleurone± (10%) on mRNA expression of the selected genes CAT, GSTP1 and SULT2B1 was determined by real-time qPCR. The effects after 24 (HT29) and 10 h (primary cells) are summarized in Table 2 and Fig. 1, respectively. In HT29 cells, the expression level of CAT was increased by trend only by the probiotics alone with a fold change of over 1.5 in comparison with the medium control (Table 2). The expression of GSTP1 was increased by the fs aleurone–, whereas the up-regulation (two-fold) was significantly different to the fs blank–. An addition of probiotics did not further enhance this effect. Incubation with the fs aleurone– resulted in an increased mRNA expression of SULT2B1. The probiotics alone had the same impact. However, treatment of the cells with the fs blank– revealed an identical effect. As opposed to the results in HT29 cells, in primary human colon cells, only the mRNA expression of the GSTP1 gene was modulated (Fig. 1). The expression was comparably up-regulated by 10% of the fs aleurone–, the probiotics alone (fs blank+) and the combination of both (fs aleurone+). But a significant difference to the fs blank was not detectable. For CAT, no altered expression levels were measured after the used incubation time.

### 3.4. Quantification of total GST activity

Total GST activity, a marker of primary chemoprevention, was measured to analyze a possible consequence of the modulated gene expression after incubation with 5% and 10% (HT29 cells) and 10% (primary cells) of fs blank± and aleurone±. The experiments revealed that GST activity was significantly modulated in a time-dependent manner in HT29 cells only in response to 10% of the test substances. Since the strongest effects were seen after 72 h, only results after 72 h are illustrated in Table 3 (left column). The fs aleurone– and the fs aleurone+ induced GST activity, whereas the addition of LGG/Bb12 to the fermentation did not further increase the effect of the fs aleurone–. However, cells incubated with the probiotics alone showed a significantly higher enzyme activity compared with the medium control and to the fs blank–, respectively. In primary human colon cells, GST activity was not induced by any of the test substances (data not shown).

Table 1  
Concentrations of the potential tumor-promoting substances DCA and ammonia in the fs

fs	DCA (μM) <sup>a</sup>		Ammonia (mM) <sup>a</sup>	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Blank–	30.70	4.30	16.33	1.42
Blank+	7.47	0.82	12.96	0.41
Aleurone–	5.02	0.38	22.42	5.34
Aleurone+	1.81	0.42	20.58	1.06

–, without LGG and Bb12; +, with LGG and Bb12.

<sup>a</sup> Because fs from two fermentations were pooled, only one determination in triplicate (shown are means and S.D.) could be conducted. A statistical analysis was therefore not possible.

### 3.5. Analysis of CAT activity

As a further marker of primary chemoprevention, the CAT activity was determined. Therefore, both HT29 and primary cells were incubated with 5% and 10% (HT29 cells) and 10% (primary cells) of all fs for 24–72 and 10 h, respectively. This analysis revealed that the CAT activity was time dependently induced in HT29 cells only in response to the incubation with 10% fs aleurone–, which was significantly different to the fs blank– (Table 3, right column). The fs aleurone+ (10%) also enhanced the enzyme activity of CAT significantly, whereas the added probiotics did not enforce the effect induced by the fs aleurone–. Since the effects were more prominent after 72 h, the enzyme activities are illustrated only after 72 h. Enzyme activity was not affected by the probiotics alone.

In contrast, the CAT activity was not affected in primary human colon cells by the incubation for 10 h with 10% of the test substances (data not shown).

### 3.6. Antigenotoxicity

To analyze whether treatment with fermented aleurone± caused an increased protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage, HT29 cells were preincubated for 24 and 48 h with the test compounds and were afterward challenged with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The treatment with the fs blank+ and fs aleurone± for 48 h (Fig. 2) but not for 24 h (data not shown) resulted in significantly reduced levels of DNA damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Interestingly, the impact of the reducing effect of fs aleurone– was significantly enhanced by the addition of the probiotics (fs aleurone+). Noteworthy, both fermented aleurone– and aleurone+ showed a difference to their respective fs blank ( $P<.05$  fs aleurone–,  $P<.10$  fs aleurone+). Neither fs blank± nor the fs aleurone± induced DNA damage on their own (data not shown). No cytotoxic impact of either substance was detectable at the applied concentration and time.

## 4. Discussion

An inverse association between dietary fiber intake and risk of colon cancer was suggested by large human trials [43,44]. The mechanisms, which may be involved in this protection, are dilution of carcinogens and procarcinogens contained in the feces, reduction of transit time, production of chemopreventive SCFA and reduction of tumor-promoting substances, for example, DCA and ammonia [45].

Table 2  
Gene expression analysis in HT29 and primary human colon cells after treatment with 10% of the fs of the feces control (blank±) and of aleurone± for 24 (HT29 cells) and 10 h (primary human colon cells), respectively, using real-time qPCR<sup>a</sup>

	HT29 cells (fold change)						Primary human colon cells (fold change)			
	CAT		GSTP1		SULT2B1		CAT		GSTP1	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
fs blank–	1.3	0.2	0.9	0.2	3.0*	0.8	1.1	0.3	1.4	0.3
fs blank+	1.8 <sup>(*)</sup>	0.4	1.2	0.4	3.0*	1.2	1.3	0.6	1.6*	0.4
fs aleurone–	2.1	0.7	2.0 <sup>(*)</sup>	0.5	2.8*	1.0	1.2	0.5	1.7*	0.6
fs aleurone+	1.9	1.0	2.5 <sup>(*)</sup>	0.9	2.2	1.3	1.2	0.3	1.8*	0.5

–, without LGG and Bb12; +, with LGG and Bb12.

<sup>a</sup> Results are normalized based on GAPDH, calculated to the medium control and expressed as fold change. Values are means and S.D. of fold change (HT29:  $n=3$ ; primary human colon cells:  $n=6$ ). In HT29 cells, Student's  $t$  test was used to calculate the differences from the medium control, which was set to 1 ( $*P<.05$ ) and to the respective fs blank ( $**P<.05$ ). Friedman test with Dunn's posttest was used to calculate the differences from the medium control ( $*P<.05$ ) in primary human colon cells. Parentheses denote that the effect varies only by trend ( $P\leq.10$ ).



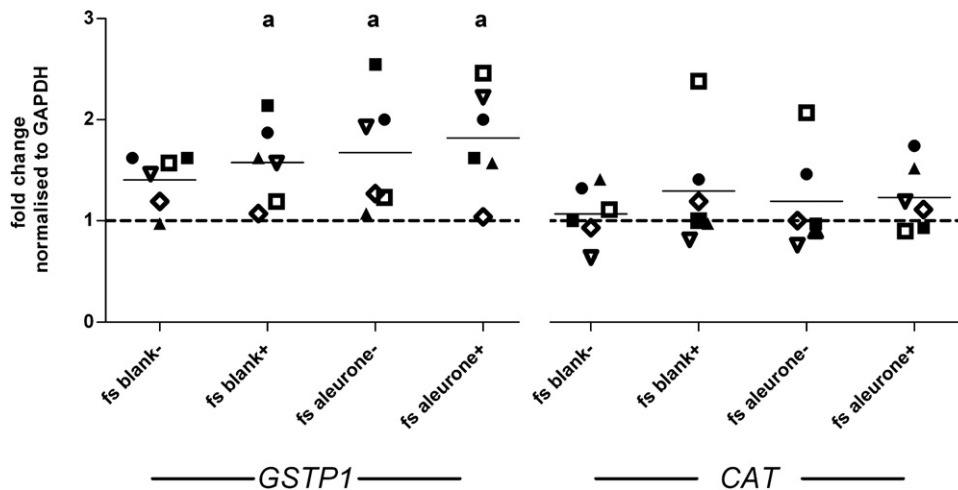


Fig. 1. Gene expression analysis of *CAT* and *GSTP1* using real-time qPCR in primary human colon cells after treatment with 10% of the fs of the feces control (blank $\pm$ ) and of aleurone $\pm$  for 10 h. Results are normalized based on GAPDH, calculated to the medium control, which was set to 1 (dotted line) and expressed as fold change. Shown are means of six donors and the variability of response of each donor. Friedman test with Dunn's posttest was used to calculate the differences from the medium control ( $^aP<.05$ ). Same symbols represent the response in one donor.

Especially, the secondary bile acid DCA, produced by a bacterial dehydroxylation of primary bile acids, showed tumor-promoting properties by acting directly on the mucosa or by promoting the effects of carcinogenic substances present in the colon [46]. Previous studies from Borowicki et al. [31] showed a decreased concentration of DCA after fermentation of wheat aleurone as a consequence of SCFA production and the resulting decrease in pH. The present study confirms that the fermentation of wheat aleurone considerably reduces the DCA concentration by about 84% compared with the fs blank $-$ . Interestingly, this effect was increased by the addition of probiotics (LGG and Bb12). In addition, probiotics were also able to decrease the amount of DCA by remarkably 76% on their own. This reduction of DCA may be caused by an increased level of SCFA resulting in a lower colonic pH and reduced activities of bacterial enzymes important for DCA formation, for example, 7 $\alpha$ -dehydroxylase [3,47]. Furthermore, an altered microflora may modulate the activities of additional enzymes involved in the formation of carcinogens, for example,  $\beta$ -glucuronidase and/or nitroreductase [47]. In addition, an enhanced binding of bile acids by probiotics and/or the increase of acidophilic bacteria may possibly support bile acid reduction [48]. Moreover, direct binding of bile acids by dietary fiber, for example, by the arabinoxylans contained in the aleurone, could also lead to reduced concentrations

in the gut lumen [49]. Thus, we could show that the addition of probiotics (LGG/Bb12) to the aleurone contributes to the protective effects of aleurone, which may be a first indication of synergistic effects. The observed decline in bile acids in the presence of dietary fiber and/or probiotics can be considered to be favorable in terms of primary colon cancer prevention.

In this study, the ammonia concentration was higher in the fs with aleurone than in the blanks, reflecting the higher protein content in the respective samples. This finding is in line with earlier results of Borowicki et al. [31]. However, the content of ammonia was reduced by the addition of the LGG and Bb12, which were used alone or in combination with aleurone. Undigested dietary protein is fermented by colonic microbes leading to the formation of cytotoxic agents like ammonia. Ammonia may promote carcinogenesis by stimulating cell proliferation, which favors the growth of already transformed cells [50]. Several studies demonstrated that the presence of fermentable carbohydrates decreases the fecal ammonia content [51–53]. This is due to the stimulation of the rapid growth of colonic bacteria by undigested carbohydrates. Bacteria can act as “nitrogen sinks” using the protein and the resulting metabolites for their own metabolism and growth [50]. The reduction of ammonia by probiotics was also shown in investigations of Sakata et al. [54], at which probiotics decreased the ammonia concentration about 56% after a one-batch fermentation. This is an indication of decreased protein degradation or increased bacterial metabolism and/or growth of colonic bacteria in the mixed bacteria culture of the fecal inoculum.

Furthermore, the effects of the different fs on mRNA expression of selected genes (*CAT*, *GSTP1* and *SULT2B1*), involved in detoxification of xenobiotics, were measured. An induction of these genes is important for primary cancer prevention by preventing the formation of ultimate carcinogens or ROS as well as by antioxidative effects [12].

SULTs represent key components of the detoxification system. They are important for different physiological processes, for example, metabolizing numerous drugs and small endogenous compounds such as bile acids. Bile acids are known substrates of the hydroxysteroid SULTs (*SULT2*) [55]. Therefore, an increased expression could improve colon cancer prevention. Fs aleurone $-$  showed a 2.8-fold increase on mRNA expression of *SULT2B1* in HT29 cells, whereas the addition of the probiotics to the aleurone (fs aleurone $+$ ) did not result in an increased *SULT2B1* gene expression. This effect was, however, also observed for the fs blank $\pm$ . The higher concentrations of secondary bile acids, for example, DCA (30.70  $\mu$ m),

Table 3  
Enzyme activities of GSTs and CAT in HT29 cells after treatment with 10% of the fs of the feces control (blank $\pm$ ) and of aleurone $\pm$  for 72 h $^a$

	HT29 cells				
	Relative GST activity (fold change)		Relative CAT activity (fold change)		
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	
fs blank—	1.4	0.2	1.6	0.3	
fs blank+	2.1	0.5	2.4	1.0	*, **
fs aleurone—	3.6	0.9	3.6	1.4	*, ***
fs aleurone+	3.2	0.5	3.0	0.4	*, ***

—, without LGG and Bb12; +, with LGG and Bb12.

$^a$  Results are calculated to the medium control and expressed as fold change. Values are means and S.D. of fold change ( $n=3$ ). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Bonferroni posttest to calculate the differences to the medium control ( $^*P<.05$ ) and two-way ANOVA with Bonferroni posttest to calculate the differences to the corresponding fs blank ( $^{***}P<.05$ ) and to the corresponding sample without LGG and Bb12 ( $^{**}P<.05$ ).

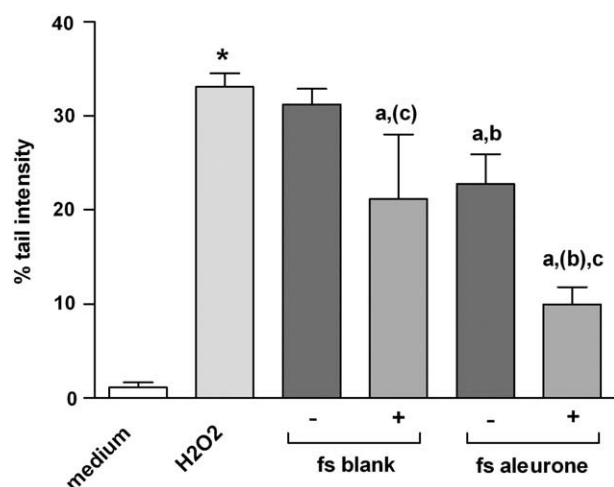


Fig. 2. Modulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage by pretreatment with 10% of fs of the feces control (blank±; -, without LGG and Bb12; +, with LGG and Bb12) and of aleurone± for 48 h in HT29 cells. Values are means and standard deviations ( $n=3$ ). Statistical analysis was performed using Student's *t* test to calculate the differences to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells ( $^aP<.05$ ), to the corresponding fs blank ( $^bP<.05$ ) and to the corresponding sample without LGG and Bb12 ( $^cP<.05$ ). Also, Student's *t* test was used to determine the difference of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells to the medium control ( $^*P<.05$ ). Parentheses denote that the effect varies only by trend ( $P\leq.10$ ).

in the fs blank– could possibly explain the high induction of *SULT2B1* expression by the fs blank–. However, it may be suggested that the same impact on mRNA expression by fs blank+ and fs aleurone– was due to the fermentation metabolite butyrate. Since to date, no data are available whether complex fs affect *SULT2B1* mRNA expression *in vitro* and *in vivo*, more studies are necessary to elucidate the underlying mechanisms of the regulation by complex fermentation samples. We were not able to examine mRNA expression of *SULT2B1* in primary cells because of the small size of the colon surgery samples.

Our study further demonstrates a significant induction of the *GSTP1* expression by 10% fs aleurone– and fs aleurone+ after 24 h in a comparable manner (2–2.5-fold) in HT29 cells, whereas the respective feces controls (fs blank±) had no effect. Other studies of our group also showed an induction of *GSTP1* mRNA expression after incubation with 10% of fermented aleurone after 24 h [56]. A study of Treptow-van Lishaut et al. [57] demonstrated an enhanced *GSTP1* mRNA expression in the colon of rats after feeding a diet rich in resistant starch. Pool-Zobel et al. [58] showed an induction of several GST after butyrate treatment of human colon primary cells, premalignant human LT97 adenoma and malignant human HT29 cancer cells. In addition, Ebert et al. [30] were able to show a significant induction of *GSTP1* mRNA expression (~1.5-fold) by 4 mM butyrate. Possibly, the comparable effects by both fs aleurone– and fs aleurone+ may be a result of the similar butyrate concentrations (fs aleurone–: 2.4 mM, fs aleurone+: 3.0 mM [59]). The ability of butyrate to inhibit histone deacetylases is a possible mechanism of inducing gene expression. This results in histone hyperacetylation and relaxation of DNA making regulatory elements of the DNA more accessible for transcription factors, resulting in an increase of transcriptional activity [12]. However, the concentration of butyrate was up to 1.6-fold lower in the fs than the used butyrate concentration (4 mM) in the study of Ebert et al. [30], and thus, synergistic effects of butyrate with other so far unknown fermentation metabolites may increase the efficacy of the fs.

As a consequence of the increased mRNA expression, the enzyme activity of total GST was increased about threefold in a comparable manner by fs aleurone– and aleurone+ after 72 h in HT29 cells. Both fs significantly differed to their respective feces control (fs blank±).

Even though the probiotics alone (fs blank+) enhanced enzyme activity on a lower level, no additional effect was seen for fs aleurone+ compared with fs aleurone–. The comparable effects on enzyme activity by fs aleurone± may be explained by the similar butyrate concentrations (fs aleurone–: 2.4 mM, fs aleurone+: 3.0 mM [59]).

Since other studies showed an increased enzyme activity of total GST after treatment with 4 mM butyrate in HT29 cells [12], our suggestion supported that butyrate could be responsible for the observed effects of the fs. Overall, these results (mRNA expression and enzyme activity) demonstrate a possible enhancement of glutathione detoxification by fermented aleurone as an important mechanism of primary chemoprevention.

In this context, on one hand, an induction of GST is favorable since it results in an enhanced detoxification of risk factors in primary cells. On the other hand, in tumor cells, the induction could increase resistance to chemotherapeutic agents. However, it may be speculated that the high concentration of butyrate (10–20 mM) *in vivo* could impair tumor cell growth before GST induction can occur [58]. Nevertheless, the HT29 cell line was often applied to investigate cancer preventive effects of food constituents as a well-established cell model for human colon cells [28–31,60].

To improve our knowledge about the effects in the target cells of carcinogenesis, we analyzed whether the fermentation samples may also protect healthy primary colon cells from carcinogens by increasing gene expression of enzymes involved in detoxification and antioxidative defence. Actually, we were able to show an induction of the *GSTP1* mRNA expression (>1.5-fold) by 10% fs aleurone– and fs aleurone+ in primary colon cells, whereas the addition of probiotics could not enhance the effect. This may be a result of similar butyrate concentrations in the respective fs. In spite of a lower butyrate concentration (1.4 mM [59]), the blank containing the probiotics had comparable effects as the fs, probably pointing to yet unidentified factors in the fecal matrix, possibly the antioxidant and antimutagenic phenol acids [61,62]. Our findings further showed that the modulation of *GSTP1* expression occurred with a high variability between the different donors, which points to differences in cellular susceptibility to xenobiotics. In primary human colon cells, the altered *GSTP1* expression was not associated with an increase of total GST activity. Possibly a 10-h incubation is too short to detect changes in protein expression levels. Therefore, an increase of the survival time of human primary cells in culture, a major limitation of this interesting model of healthy colon cells, may be necessary to analyze the effects on enzyme activities in detail. Efforts to improve the models of healthy colon cells are therefore important to analyze the effects of nutritional factors on markers of chemoprevention and a major focus of research of our and other groups.

In HT29 cells, the expression of CAT was increased ( $\geq 1.5$ -fold) by trend for the fs containing only the probiotics (fs blank+). Interestingly, the potential prebiotic (fs aleurone–, 2.1-fold) and synbiotic (fs aleurone+, 1.9-fold) indicated the same effect on CAT compared with the fs blank+ (Student's *t* test:  $P=.13$  for fs aleurone–,  $P=.27$  for fs aleurone+). Measurements of enzyme activity of CAT as a possible consequence of mRNA expression resulted in an enhanced activity (threefold) by both fs aleurone– and fs aleurone+ in HT29 cells, whereas the addition of probiotics did not increase this effect. In general, the increased enzyme activity may be considered to be important because CAT potentially plays a key role in cancer prevention by reducing oxidative stress, in particular, due to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [22]. In primary colon cells, the mRNA expression and enzyme activity of CAT were not modulated, which could be a result of the shorter incubation time (10 h) or a reduced susceptibility to the treatment with the fs in comparison with HT29 cells. Furthermore, it cannot be excluded that primary colon cells

could already be at a higher level of gene expression that could not increase any more. In particular, it has to be kept in mind that the primary cells are isolated from human colon surgeries, and therefore, cells from different donors may react differently. This is supported by our findings showing that the CAT mRNA was expressed with an interindividual variability in human primary colon cells, which points to large differences in cellular susceptibility to xenobiotics between the donors. However, Sauer et al. showed an induction of CAT activity by butyrate treatment (10 mM) in primary human colon cells after 2 h. In this study, it was further demonstrated that 15% of the butyrate was taken up from the cell culture medium by primary cells after 4 h, whereas after 12 h, only 5% of butyrate were still found in the cells [23]. Fitch and Fleming [63] reported that in the colon, the absorbed butyrate is partly secreted out of the cells and reaches the blood stream. Thus, the increase of butyrate concentration in the culture medium may be due to the enhanced secretion of butyrate out of the cells. Hence, it could be speculated that after an incubation of 10 h, most of the butyrate of the fermented samples is probably secreted by the primary cells, and thus, no effects were seen at this time.

This study further reports a reduction of DNA damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by the fs aleurone— in the preincubated HT29 cells after 48 h. Interestingly, the addition of the probiotics (fs aleurone+) increased this antigenotoxic effect of the fs. The more efficient reduction of the DNA damage by the addition of LGG/Bb12 is in line with results from earlier studies. *In vivo* rat studies, for example, have shown that fecal water derived from prebiotic- or synbiotic-treated animals exerts antigenotoxic effects in human cell lines [64]. In a human intervention trial using a synbiotic (oligo-fructose-enriched inulin and LGG/Bb12), a significantly decreased level of DNA damage in the colonic mucosa in polyp patients was also measured at the end of the intervention period [16]. In addition, *in vivo* rat studies by Rowland et al. [65] showed a most potent inhibitory effect on azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats treated with the combination of the probiotic *Bifidobacterium longum* and prebiotic inulin compared with the single compounds.

Moreover, butyrate can affect intracellular antioxidative enzymes, which could also be responsible for the reduction of DNA damage [66]. In the present study, the reduced DNA damage could be possible caused by the increased enzyme activity of both GST and CAT, which are involved in the cellular protection from the products of oxidative stress [22,67]. Thereby, the CAT is the most prominent enzyme for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition. Moreover, it could be assumed that the antigenotoxicity possibly arises from direct antioxidative activities, for example, by ferulic acid [68], or modification of DNA repair mechanisms [11,19]. Thus, especially for butyrate, it has been shown that it increases chromatin accessibility to DNA repair enzymes in HT29 cells and could therefore decrease DNA damage [19]. An explanation for the additional effect of the probiotics in reducing DNA damage could possibly be the scavenging of carcinogenic intermediates, for example, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by exocellular polysaccharides, which was demonstrated for yogurt starter culture bacteria [69]. Furthermore, the additional reduction of DNA damage by the addition of the probiotics (fs aleurone+) may be also the consequences of an enhanced release of ferulic acid from the arabinoxylane, which is highly enriched in wheat aleurone [70] and is well recognized for its free radical scavenging property [68,71].

In conclusion, our investigations highlighted mechanisms that support an enhanced potential of detoxification of cancer risk factors by the complex dietary fiber source wheat aleurone that may influence initiation and progression of cancer. More importantly, we showed evidence that protection can be increased not only in HT29 cells but also in normal colon epithelial cells from human surgeries, which emphasizes a possible role of wheat aleurone in primary cancer prevention.

Hence, the modulation of markers of primary chemoprevention indicates that wheat aleurone may possibly have a cancer preventive potential, which could be partially favored by the addition of the probiotics LGG/Bb12. Nevertheless, further studies using isolated human primary cells as well as animal studies and/or human intervention trials are required to define a role in primary cancer prevention by fermentation products of wheat aleurone and probiotics under *in vivo* conditions.

## Acknowledgments

We thank Wachter N, Kampffmeyer, Food Innovation GmbH, Hamburg, Germany, for providing the wheat aleurone and von Reding W., Bühler AG, Switzerland, for the preparation of the aleurone fraction from wholemeal wheat flour. We are grateful to Mothes H, Hospital, Friedrich-Schiller University, Jena, Germany, for providing the human colon tissue samples. Furthermore, we thank all donors of colon tissue samples for giving their informed consent and supporting our studies. Finally, we gratefully acknowledge the excellent assistance by Ms. Woschee E. and Ms. Michelmann A.

## References

- [1] West NJ, Boustiere C, Fischbach W, Parente F, Leicester RJ. Colorectal cancer screening in Europe: differences in approach; similar barriers to overcome. *Int J Colorectal Dis* 2009.
- [2] Martinez ME, Marshall JR, Giovannucci E. Diet and cancer prevention: the roles of observation and experimentation. *Nat Rev Cancer* 2008.
- [3] Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biol Ther* 2006;5:1265–9.
- [4] Grootaert C, Van den AP, Marzorati M, Broekaert WF, Courtin CM, Delcour JA, et al. Comparison of prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides and inulin in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;69:231–42.
- [5] Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 2004;17:259–75.
- [6] Davis CD, Milner JA. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J Nutr Biochem* 2009;20:743–52.
- [7] Fotiadis CI, Stoidis CN, Spyropoulos BG, Zografos ED. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2008;14:6453–7.
- [8] Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol* 2009;27:202–9.
- [9] Manning TS, Gibson GR. Microbial-gut interactions in health and disease. *Prebiotics Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:287–98.
- [10] Kolida S, Tuohy K, Gibson GR. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *Br J Nutr* 2002;87(Suppl 2):S193–7.
- [11] Abrahamse SL, Pool-Zobel BL, Reckemmer G. Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis* 1999;20:629–34.
- [12] Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Miene C, et al. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat Res* 2009.
- [13] Scheppach W, Weiler F. The butyrate story: old wine in new bottles? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7:563–7.
- [14] Sengupta S, Muir JG, Gibson PR. Does butyrate protect from colorectal cancer? *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:209–18.
- [15] Grootaert C, Verstraete W, Van de WT. Arabinoxylan oligosaccharides with different structures exert a bifidogenic effect in a mixed intestinal community. *Trends in Food Science & Technology* 2006;18:64–71.
- [16] Rafta J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, et al. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr* 2007;85:488–96.
- [17] Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004;266:37–56.
- [18] Hamer HM, Jonkers DM, Bast A, Vanhoutvin SA, Fischer MA, Kodde A, et al. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clin Nutr* 2009;28:88–93.
- [19] Rosignoli P, Fabiani R, De BA, Spinazzi F, Agea E, Pelli MA, et al. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* 2001;22:1675–80.
- [20] Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez, I dc. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32:595–603.
- [21] Gupta A, Butts B, Kwei KA, Dvorakova K, Stratton SP, Briehl MM, et al. Attenuation of catalase activity in the malignant phenotype plays a functional role in an *in vitro* model for tumor progression. *Cancer Lett* 2001;173:115–25.



- [22] Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:239–67.
- [23] Sauer J, Richter KK, Pool-Zobel BL. Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J Nutr Biochem* 2007;18:736–45.
- [24] Pool-Zobel BL, Abrahamse SL, Collins AR, Kark W, Gugler R, Oberreuther D, et al. Analysis of DNA strand breaks, oxidized bases, and glutathione S-transferase P1 in human colon cells from biopsies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:609–14.
- [25] Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M, Czczot H. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer. *Acta Biochim Pol* 2009;56:663–70.
- [26] Hoensch H, Peters WH, Roelofs HM, Kirch W. Expression of the glutathione enzyme system of human colon mucosa by localisation, gender and age. *Curr Med Res Opin* 2006;22:1075–83.
- [27] Saini SP, Sonoda J, Xu L, Toma D, Uppal H, Mu Y, et al. A novel constitutive androstane receptor-mediated and CYP3A-independent pathway of bile acid detoxification. *Mol Pharmacol* 2004;65:292–300.
- [28] Gleit M, Kirmse A, Habermann N, Persin C, Pool-Zobel BL. Bread enriched with green coffee extract has chemoprotective and antigenotoxic activities in human cells. *Nutr Cancer* 2006;56:182–92.
- [29] Kautenburger T, Beyer-Sehlmeyer G, Festag G, Haag N, Kuhler S, Kuchler A, et al. The gut fermentation product butyrate, a chemopreventive agent, suppresses glutathione S-transferase theta (hGSTT1) and cell growth more in human colon adenoma (LT97) than tumor (HT29) cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131:692–700.
- [30] Ebert MN, Beyer-Sehlmeyer G, Liegibel UM, Kautenburger T, Becker TW, Pool-Zobel BL. Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal. *Nutr Cancer* 2001;41:156–64.
- [31] Borowicki A, Stein K, Scharlau D, Scheu K, Brenner-Weiss G, Obst U, et al. Fermented wheat aleurone inhibits growth and induces apoptosis in human HT29 colon adenocarcinoma cells. *Br J Nutr* 2010;103:360–9.
- [32] Bohm A, Bogoni C, Behrens R, Otto T. Method for the extraction of aleurone from bran. (*Wo* 02/15711 A2) 2002.
- [33] Schaeferhenrich A, Sendt W, Scheele J, Kuechler A, Liehr T, Claussen U, et al. Putative colon cancer risk factors damage global DNA and TP53 in primary human colon cells isolated from surgical samples. *Food Chem Toxicol* 2003;41:655–64.
- [34] Rogler G, Daig R, Aschenbrenner E, Vogl D, Schlottmann K, Falk W, et al. Establishment of long-term primary cultures of human small and large intestinal epithelial cells. *Lab Invest* 1998;78:889–90.
- [35] Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* 2001 Appendix 3:Appendix.
- [36] Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e36.
- [37] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- [38] Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6.
- [39] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249:7130–9.
- [40] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [41] Gleit M, Matuschek M, Steiner C, Bohm V, Persin C, Pool-Zobel BL. Initial *in vitro* toxicity testing of functional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells. *Toxicol In Vitro* 2003;17:723–9.
- [42] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184–91.
- [43] Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003;361:1496–501.
- [44] Peters U, Sinha R, Chatterjee N, Subar AF, Ziegler RG, Kulldorff M, et al. Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *Lancet* 2003;361:1491–5.
- [45] Park Y, Hahm KS. Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:507–16.
- [46] Zampa A, Silvi S, Fabiani R, Morozzi G, Orpianesi C, Cresci A. Effects of different digestible carbohydrates on bile acid metabolism and SCFA production by human gut micro-flora grown in an *in vitro* semi-continuous culture. *Anaerobe* 2004;10:19–26.
- [47] McGarr SE, Ridlon JM, Hylemon PB. Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:98–109.
- [48] Pigeon RM, Cuesta EP, Gililliand SE. Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria. *J Dairy Sci* 2002;85:2705–10.
- [49] Das D, Arber N, Jankowski JA. Chemoprevention of colorectal cancer. *Digestion* 2007;76:51–67.
- [50] Birkett A, Muir J, Phillips J, Jones G, O'Dea K. Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans. *Am J Clin Nutr* 1996;63:766–72.
- [51] Lupton JR, Marchant LJ. Independent effects of fiber and protein on colonic luminal ammonia concentration. *J Nutr* 1989;119:235–41.
- [52] Vince AJ, McNeil NI, Wager JD, Wrong OM. The effect of lactulose, pectin, arabinogalactan and cellulose on the production of organic acids and metabolism of ammonia by intestinal bacteria in a faecal incubation system. *Br J Nutr* 1990;63:17–26.
- [53] Mortensen PB. The effect of oral-administered lactulose on colonic nitrogen metabolism and excretion. *Hepatology* 1992;16:1350–6.
- [54] Sakata T, Kojima T, Fujieda M, Miyakozawa M, Takahashi M, Ushida K. Probiotic preparations dose-dependently increase net production rates of organic acids and decrease that of ammonia by pig cecal bacteria in batch culture. *Dig Dis Sci* 1999;44:1485–93.
- [55] Gamage N, Barnett A, Hempel N, Duggleby RG, Windmill KF, Martin JL, et al. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol Sci* 2006;90:5–22.
- [56] Stein K, Borowicki A, Scharlau D, Gleit M. Fermented wheat aleurone induces enzymes involved in detoxification of carcinogens and in antioxidative defence in human colon cells. *Br J Nutr* 2010;1–11.
- [57] Treptow-van Lishaut S, Rechkemmer G, Rowland I, Dolara P, Pool-Zobel BL. The carbohydrate crystalline and colonic microflora modulate expression of glutathione S-transferase subunits in colon of rats. *Eur J Nutr* 1999;38:76–83.
- [58] Pool-Zobel BL, Selvaraju V, Sauer J, Kautenburger T, Kiefer J, Richter KK, et al. Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* 2005;26:1064–76.
- [59] Borowicki A, Michelmann A, Stein K, Scharlau D, Scheu K, Obst U, et al. Fermented wheat aleurone enriched with probiotic strains LGG and Bb12 modulates markers of tumor progression in human colon cells. *Nutr Cancer* 2011;63:151–60.
- [60] Fenton JJ, Hord NG. Stage matters: choosing relevant model systems to address hypotheses in diet and cancer chemoprevention research. *Carcinogenesis* 2006;27:893–902.
- [61] Ferguson LR, Harris PJ. The dietary fibre debate: more food for thought. *Lancet* 2003;361:1487–8.
- [62] Roberfroid MB. Introducing inulin-type fructans. *Br J Nutr* 2005;93(Suppl 1):S13–25.
- [63] Fitch MD, Fleming SE. Metabolism of short-chain fatty acids by rat colonic mucosa *in vivo*. *Am J Physiol* 1999;277:G31–40.
- [64] van LJ, Clune Y, Bennett M, Collins JK. The SYNCAN project: goals, set-up, first results and settings of the human intervention study. *Br J Nutr* 2005;93(Suppl 1):S91–8.
- [65] Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 1998;19:281–5.
- [66] Sandstrom BE, Marklund SL. Effects of variation in glutathione peroxidase activity on DNA damage and cell survival in human cells exposed to hydrogen peroxide and t-butyl hydroperoxide. *Biochem J* 1990;271:17–23.
- [67] Hayes JD, McLellan LJ. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 1999;31:273–300.
- [68] Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Taniguchi H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric Food Chem* 2002;50:2161–8.
- [69] Wollowski I, Ji ST, Bakalinsky AT, Neudecker C, Pool-Zobel BL. Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats. *J Nutr* 1999;129:77–82.
- [70] Buri RC, von Reding W, Gavin MH. Description and characterization of wheat aleurone. *Cereal Foods World* 2004;49:274–81.
- [71] Di DF, Perluigi M, Foppoli C, Blarmino C, Coccia R, De MF, et al. Protective effect of ferulic acid ethyl ester against oxidative stress mediated by UVB irradiation in human epidermal melanocytes. *Free Radic Res* 2009;43:365–75.

## 4 Weitere Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Fermentationsüberstände und –pellets nach erfolgter *in vitro* Fermentation

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde Weizenaleuron (Tab. 2) mit/ohne Zugabe von verschiedenen Bakterienstämmen in zwei Serien unter Verwendung der *in vitro* Fermentationsmethode (**Publikation I**) verdaut und fermentiert (Tab. 3). Als Kontrolle diente eine Probe ohne Zugabe einer Testsubstanz (Fäzeskontrolle (Blank)). Um ausreichend Probenmaterial zu erhalten, erfolgten die *in vitro* Fermentationen mehrmals unter gleichen Bedingungen (n=2 bzw. 6). Im Anschluss wurden durch Zentrifugation die Fermentationsüberstände (FÜ) und Fermentationspellets gewonnen und vereinigt, wodurch der Einfluss einer individuellen Ernährung der Spender des Inokulums minimiert wurde.

Die resultierenden FÜ wurden hinsichtlich pH-Wert und ausgewählter Metabolite (SCFA und Gallensäuren (bestimmt am Forschungszentrum Karlsruhe) sowie Ammoniak) analysiert. Die Konzentration an SCFA wurde nach einem Verfahren von Wang *et al.* (180) mittels GC-MS und der Gehalt an Gallensäuren nach Burkhardt *et al.* (181) mittels HPLC-MS quantifiziert. Die Konzentrationsbestimmung des Ammoniaks erfolgte kolorimetrisch über die Berthelot-Reaktion (182).

Im Rahmen des Verbundprojektes „Triple Plus Functional Food“ wurden am Forschungszentrum Karlsruhe zudem die Fermentationspellets analysiert, um Informationen über den Einfluss der Fermentation der verschiedenen Testsubstanzen auf die bakterielle Zusammensetzung des eingesetzten Fäzes zu erhalten. Als relevante Vertreter einer positiven bakteriellen Zusammensetzung wurden die Bakteriengruppen, wie *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, *Enterokokken* und die „Rest“-*Eubakteria* untersucht. Die Bestimmung dieser in den Fermentationspellets erfolgte mittels quantitativer PCR (qPCR) (siehe Anhang Tab. 10) unter Anwendung des ABI7300 *real-time* PCR Systems (Applied Biosystems, Warrington, UK). Hierbei wurden je 10 ng der extrahierten und aufgereinigten DNA mit gruppenspezifischen Primern amplifiziert und durch Einbau eines Farbstoffs (SYBR Green) oder durch das Signal aus einer DNA-Sonde (Primer/Probe) (siehe Anhang Tab. 9) die Mengen des Zielfragmentes detektiert. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Kalibriergerade mit DNA aus den jeweiligen Bakterienstämmen als Positivkontrolle. Nach Detektion konnte mit Hilfe der Genomgröße der einzelnen Bakterienspezies auf Zelläquivalente umgerechnet und so die Zellzahl an Bakterien erfasst werden. Die Ergebnisse wur-

den als prozentuale Zusammensetzung der Bakteriengruppen im Bezug auf die Gesamtbakterien (*Eubacteria*) angegeben.

Tab. 2 Chemische Zusammensetzung von Weizenaleuron (EU,US)

	[g/100 g TM]	
	EU	US
	Aleuron	Aleuron
Ballaststoffe gesamt,	47,4	46,6
wasserunlöslich	42,8	41,3
wasserlöslich	4,5	5,4
Arabinoxylane	26,1	25,3
$\beta$ -Glucane	4,2	4,7
Stärke	8,9	3,8
D-Glukose	0,38	0,70
Protein	19,4	22,6
Fett	6,6	6,1
Mineralstoffe	8,6	10,6

EU, europäisch; TM, Trockenmasse; US, amerikanisch

Tab. 3 Charakterisierung der Fermentationsserien

	Testsubstanzen
Fermentation I (n=6)	Europäisches und amerikanisches Weizenaleuron
Fermentation II (n=2)	Europäisches Weizenaleuron mit/ohne Zugabe von Probiotika LGG <sup>®</sup> /Bb12 und <i>Clostridium butyricum</i>

Bb12, *Bifidobacterium bifidum* 12; LGG, *Lactobacillus rhamnosus* GG; n, Anzahl der Versuche

#### 4.1.1 In vitro Fermentation I

##### 4.1.1.1 Fermentationsüberstände

Die Fermentation des EU und US Aleurons führte zu einer deutlichen pH-Wert-Senkung im Vergleich zum Blank (Tab. 4). Dies spiegelt wahrscheinlich die höheren Konzentrationen der SCFA wider. Des Weiteren war die Fermentation des EU und US Aleurons mit einem Anstieg der Gesamt-SCFA in den gewonnenen FÜ verbunden. Die Konzentration jeder SCFA war im FÜ EU Aleuron niedriger als im FÜ US Aleuron. Dahingegen verschob sich das Verhältnis von Azetat: Propionat: Butyrat zu gleichen Teilen zugunsten des Butyrats. Tab. 4 zeigt ebenso den Einfluss der Testsubstanzen auf die Konzentration der primären Gallensäure Cholsäure (CA) und der sekundären Gallensäure Deoxycholsäure (DCA) in den FÜ. Die Konzentrationen der aufgeführten Gallensäuren wurden durch

beide Ballaststoffquellen im Vergleich zur Kontrolle (FÜ Blank) gesenkt, wobei der Effekt der Reduktion der DCA besonders deutlich war. Zwischen den Aleuronsorten bestand kein nennenswerter Unterschied. Die Proteinkonzentration der Ausgangsstoffe (Tab. 2; EU Aleuron: 19,4 % in Trockenmasse (TM), US Aleuron: 22,6 % in TM) spiegelte sich im Gehalt von Ammoniak wider, der für beide Aleuronsorten im Vergleich zum FÜ Blank erhöht war (Tab. 4). Der bereits im FÜ Blank enthaltene Ammoniak resultierte wahrscheinlich aus dem Proteingehalt der Fäzes der einzelnen Spender.

Tab. 4 pH-Wert und Konzentrationen ausgewählter Metabolite in den FÜ nach *in vitro* Fermentation ( $n=6$ ).<sup>s</sup>

	pH-Wert	SCFA [mM]			Verhältnis der SCFA [%]	Gallensäuren [μM]		Ammoniak [mM]
		Azetat	Propionat	Butyrat		CA	DCA	
FÜ Blank (Fäzeskontrolle)	6,45	10,75	4,56	4,56	54:23:23	0,35	46,65	11,92
FÜ EU Aleuron	5,76	21,01	7,12	20,32	43:15:42	0,20	5,04	16,63
FÜ US Aleuron	5,78	25,41	9,06	24,23	43:16:41	0,23	5,93	21,28

CA, Cholsäure; DCA, Deoxycholsäure FÜ, Fermentationsüberstand; EU, europäisch; SCFA, kurzkettige Fettsäuren; US, amerikanisch; n, Anzahl der Versuche

<sup>s</sup> Da die jeweiligen FÜ der 6 Fermentationen vereinigt wurden, war eine statistische Auswertung nicht möglich.

#### 4.1.1.2 Fermentationspellets

Die Untersuchungen wiesen auf eine Zunahme der Gesamtzellzahl in den FÜ EU und US Aleuron hin. Im Ausgangsmaterial (Blank) zeigte sich bereits ein hoher Anteil der *Bifidobacteria*, welcher sich im geringen Maß durch die Fermentation des EU Aleurons steigern ließ. Die Fermentation von US Aleuron ergab eine deutliche Verschiebung der Bakterienzusammensetzung, wobei diese Verschiebung mit einer Erniedrigung der *Bifidobacteria* und einer Erhöhung der „Rest“-Eubakteria einherging (Tab. 5). Der prozentuale Anteil der *Enterokokken* wurde sowohl durch EU Aleuron als auch US Aleuron im Vergleich zum Blank um fast die Hälfte reduziert.

Tab. 5 Prozentuale Bakterienzusammensetzung in den Fermentationspellets der Fermentation I (n=6).

	Zellzahl gesamt	„Rest“-Eubakteria gesamt		<i>Lactobacilli</i>		<i>Bifidobacteria</i>		<i>Enterokokken</i>	
	[ $\times 10^8$ /ml]	[%]	[ $\times 10^8$ /ml]	[%]	[ $\times 10^8$ /ml]	[%]	[ $\times 10^8$ /ml]	[%]	[ $\times 10^8$ /ml]
Blank (Fäzeskontrolle)	57,71	62,53	36,08	0,06	0,04	37,08	21,4	0,25	0,14
EU Aleuron	112,37	56,70	63,72	0,10	0,11	42,83	48,13	0,15	0,17
US Aleuron	196,99	81,55	160,66	0,11	0,22	18,02	35,49	0,15	0,29

EU, europäisch; US, amerikanisch

#### 4.1.2 *In vitro* Fermentation II

Weizenaleuron wurde mit/ohne Zugabe der Probiotikastämme *Lactobacillus rhamnosus* GG<sup>®</sup> (LGG<sup>®</sup>) und *Bifidobacterium bifidum* 12 (Bb12) sowie dem Butyratbildner *Clostridium butyricum*, der durch Kong *et al.* (183) ebenso als probiotischer Bakterienstamm deklariert wurde, *in vitro* verdaut und fermentiert. Hierbei verlief die Fermentation mit oder ohne Zugabe eines Fäzes-Inokulums. Die resultierenden FÜ aus 10 verschiedenen Ansätzen sind in Tab. 6 aufgeführt.

Die Wahl der Probiotika LGG<sup>®</sup> und Bb12 erfolgte auf Basis von Bakterienstämmen, die Bestandteile zahlreicher funktioneller Lebensmittel sind. Die Kombination beider Stämme (LGG<sup>®</sup> und Bb12) unterschiedlicher Spezies wurde verwendet, da eine Vielzahl von Studien gezeigt hat, dass ein Gemisch von Bakterienstämmen von mehr als einer Gattung effektiver wirkt (z. B. durch eine bessere Kolonisation des Darms) als ein Stamm allein oder die Kombination mehrere Stämme der gleichen Gattung (184).



Tab. 6 Verwendete Fermentationsansätze.

Ansatz	Bezeichnung
FÜ1	Blank mit Fäzes
FÜ2	Blank mit Fäzes + LGG <sup>®</sup> & Bb12
FÜ3	Blank mit Fäzes + LGG <sup>®</sup> & Bb12 + <i>Clostridium butyricum</i>
FÜ4	EU-Aleuron mit Fäzes
FÜ5	EU-Aleuron mit Fäzes + LGG <sup>®</sup> & Bb12
FÜ6	EU-Aleuron ohne Fäzes + LGG <sup>®</sup> & Bb12
FÜ7	EU-Aleuron mit Fäzes + LGG <sup>®</sup> & Bb12 + <i>Clostridium butyricum</i>
FÜ8	EU-Aleuron ohne Fäzes + LGG <sup>®</sup> & Bb12 + <i>Clostridium butyricum</i>
FÜ9	2× EU-Aleuron mit Fäzes + LGG <sup>®</sup> & Bb12
FÜ10	2× EU-Aleuron mit Fäzes + LGG <sup>®</sup> & Bb12 + <i>Clostridium butyricum</i>

Bb12, *Bifidobacterium bifidum* 12; FÜ, Fermentationsüberstand; LGG<sup>®</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* GG<sup>®</sup>; 2×, doppelte Menge

#### 4.1.2.1 Fermentationsüberstände

Bezogen auf die Fäzeskontrolle (FÜ1) führte die Fermentation des Weizenaleurons insgesamt zu einer deutlichen pH-Wert-Senkung (Tab. 7). Die Fermentationen zusammen mit den Probiotika mit/ohne Zugabe der Fäzes (FÜ5/FÜ6) resultierten ebenfalls in einem erniedrigten pH-Wert. Die Zugabe von *Clostridium butyricum* (FÜ7/FÜ8) hatte in keinem Fall einen zusätzlichen Effekt auf die pH-Wert-Senkung. Die Werte spiegelten den bakteriellen Abbau des Aleurons wider, wobei dieser nur in den FÜ mit Fäzeszugabe mit einer erhöhten Bildung von Azetat, Propionat und Butyrat verbunden war. So konnte durch die bakterielle Fermentation von Aleuron allein (FÜ4) im Vergleich zur Fäzeskontrolle (FÜ1) die Gesamtkonzentration der SCFA um >100 % erhöht werden (FÜ1: 24,97 mM, FÜ4: 55,71 mM). Hierbei wurde besonders die Butyratbildung gesteigert (4-fach). Eine unterstützende Fermentation des Aleurons durch die Probiotika (FÜ5) resultierte ebenfalls in einer zunehmenden SCFA-Produktion. *Clostridium butyricum* hatte wiederum keinen weiteren Effekt. Durch den Einsatz der doppelten Menge an fermentierbarer Substanz (FÜ9 und FÜ10) konnte die Produktion von SCFA zusätzlich gesteigert werden. Eine alleinige bakterielle Fermentation durch die Probiotika (FÜ6) führte anschließend zur Bildung von Azetat, wobei Propionat und Butyrat nicht nachweisbar waren. *Clostridium butyricum* (FÜ8) kann hingegen Azetat und weitere Fermentationsmetabolite verstoffwechseln, so dass vermutlich darüber zusätzlich Butyrat gebildet wurde.

Generell konnte nur in FÜ6 und FÜ8 – ohne Zugabe des Fäzes-Inokulums – hohe Mengen an CA nachgewiesen werden. Die Fermentation von Aleuron (FÜ3-FÜ5, FÜ7, FÜ9, FÜ10) führte im Vergleich zur Fäzeskontrolle zu einer Abnahme des Gehaltes an DCA. Hierbei konnte eine Zugabe der Probiotika die Verminderung der DCA-Menge begünstigen.

Die Ammoniakkonzentration in den gebildeten FÜ war erwartungsgemäß mit dem hohen Proteingehalt im Aleurons assoziiert (19,4 % in TM), wobei die Bildung durch die Zugabe von Probiotika reduziert wurde.

Tab. 7 pH-Wert und Konzentrationen ausgewählter Metabolite in den FÜ nach *in vitro* Fermentation ( $n=2$ ).<sup>s</sup>

	pH-Wert	SCFA [mM]			Verhältnis der SCFA [%]	Gallensäuren [µM]		Ammoniak [mM]
		Azetat	Propionat	Butyrat		CA	DCA	
FÜ1	6,38	12,80	5,90	6,27	51:24:25	0,00	30,70	16,33
FÜ2	5,88	14,69	7,98	14,21	40:22:38	0,00	7,47	12,96
FÜ3	5,86	11,88	6,96	13,24	37:22:41	0,11	9,42	14,24
FÜ4	5,70	20,71	11,20	23,80	37:20:43	0,00	5,02	22,42
FÜ5	5,45	21,59	12,01	29,73	34:19:47	< 0,10	1,81	20,58
FÜ6	5,28	12,81	0,00	0,00	100:0:0	14,90	1,76	0,00
FÜ7	5,45	23,84	11,91	32,05	35:18:47	< 0,10	2,49	21,98
FÜ8	5,25	3,64	0,00	2,14	63:0:37	8,85	1,42	0,00
FÜ9	5,31	25,08	12,85	34,18	35:18:47	< 0,10	0,89	23,90
FÜ10	5,32	33,78	15,84	37,47	39:18:43	< 0,10	< 0,10	26,32

SCFA, kurzkettige Fettsäuren; FÜ, Fermentationüberstand; n.n., nicht nachweisbar

<sup>s</sup> Da die jeweiligen FÜ der 6 Fermentationen vereinigt wurden, war eine statistische Auswertung nicht möglich.

#### 4.1.2.2 Fermentationspellets

Für die Bestimmung der bakteriellen Zusammensetzung wurden die entsprechenden Fermentationspellets der FÜ1 (Blank –), 2 (Blank +), 4 (Aleuron –) und 5 (Aleuron +) verwendet, welche durch Zentrifugation der Fermentationsproben gewonnen wurden. Generell hatte das Ausgangsmaterial (Blank) für die Fermentation II eine niedrige Gesamt-Zellzahl, welche durch die Fermentation der Testsubstanzen bis zu 8-fach anstieg. Die Fermentation des Aleurons ohne die Probiotika LGG®/Bb12 (Aleuron –) resultierte in ei-

ner deutlichen Verschiebung der Bakterienzusammensetzung im Vergleich zum Blank –, was mit in einer Zunahme der *Bifidobacteria* um das 17-fache und der *Lactobacilli* um das 3-fache verbunden war (Tab. 8). Die Fermentation des Aleurons mit Zugabe von LGG<sup>®</sup>/Bb12 (Aleuron +) äußerte sich ebenso in einer Erhöhung beider Bakteriengruppen im Vergleich zum Blank –. Zudem wurde durch die Zugabe der Probiotika die Zunahme an *Lactobacilli* im Vergleich zum Aleuron – weiter begünstigt. Allerdings lag der Anteil der *Bifidobacteria* deutlich unter dem des Aleuron – und der entsprechenden Fäzeskontrolle (Blank +). Das generierte Fermentationspellet aus der alleinigen Fermentation der LGG<sup>®</sup>/Bb12 (Blank +) war in seiner Bakterienzusammensetzung zugunsten der *Lactobacilli* (2-fach) und *Bifidobacteria* (11-fach) im Vergleich zum Blank – verschoben. Die *Enterokokken* konnten durch die Fermentation der Testsubstanzen nicht bedeutend beeinflusst werden.

Tab. 8 Prozentuale Bakterienzusammensetzung in den Fermentationspellets der Fermentation II (n=2).

	Zellzahl, gesamt [×10 <sup>8</sup> /ml]	„Rest“- Eubakteria, gesamt		<i>Lactobacilli</i>		<i>Bifidobacteria</i>		<i>Enterokokken</i>	
		[%]	[×10 <sup>8</sup> /ml]	[%]	[×10 <sup>8</sup> /ml]	[%]	[×10 <sup>8</sup> /ml]	[%]	[×10 <sup>8</sup> /ml]
Blank – (Fäzeskontrolle –)	79,90	99,56	79,65	0,05	0,04	0,37	0,30	0,01	<0,01
Blank + (Fäzeskontrolle +)	304,22	95,89	291,54	0,10	0,30	3,96	12,04	0,03	0,09
Aleuron –	414,96	93,53	388,13	0,15	0,60	6,28	26,05	0,02	0,08
Aleuron +	630,56	97,19	612,82	0,21	1,33	2,56	16,15	0,01	0,07

– ohne Zugabe der Probiotika LGG<sup>®</sup>/Bb12; + mit Zugabe der Probiotika LGG<sup>®</sup>/Bb12

## 5 Diskussion

### 5.1 *In vitro* Fermentation

*In vitro* Verdauungs- und Fermentationssysteme eignen sich für Untersuchungen gesundheitsfördernder bzw. -schädigender Effekte verschiedener, komplexer Nahrungsmittel und einzelner Inhaltsstoffe. Die Modellsysteme bieten vor allem die Möglichkeit, den physiologischen Abbau von Nahrungskomponenten nachzuvollziehen oder aber auch die Auswirkungen der Nährstoffe auf die Entwicklung der Darmflora zu erfassen. Dabei variieren diese Systeme in ihrer Komplexität und müssen je nach Fragestellung entsprechend ausgewählt werden. Eine Übersicht zu den einzelnen Modellen liefern sowohl Macfarlane und Macfarlane (185) als auch Scharlau *et al.* (170).

Zellkulturbasierte Untersuchungen mit *in vitro* hergestellten komplexen FÜ können erste Hinweise über den Einfluss von Darmfermentationsmetaboliten auf die Kolonozyten und die damit verbundenen Mechanismen liefern. Untersuchungen mit FÜ im zellulären System existieren bisher nur in einer sehr geringen Anzahl, wobei nur die Wirkung von einfachen, durch die alleinige *in vitro* Simulation der Dickdarmpassage hergestellten Fermentationsproben bestimmt werden konnten (160, 186, 187). Fermentationsproben aus komplexen *in vitro* Systemen erwiesen sich in Zellkulturexperimenten bisher als zytotoxisch und daher nicht einsetzbar (178). Diese Proben dienen vorrangig zur chemischen Analyse verschiedener Fermentationsmetabolite, wie SCFA und Gallensäuren. Um Effekte komplexer Nahrungsmittel auf Kolonozyten erfassen zu können, ist es jedoch notwendig, diese Nahrungsmittel zuvor in geeigneten Testsystemen unter annähernd physiologischen Bedingungen zu verdauen und zu fermentieren.

Ein wesentliches Ziel der Arbeit war somit, ein *in vitro* Modell zur Verdauung und Fermentation komplexer Proben zu etablieren, welches auf der bereits bewährten Dickdarmsimulationsmethode von Barry *et al.* (171) aufgebaut werden sollte. Die damit generierten Fermentationsproben sollten anschließend in Zellkulturexperimenten einsetzbar sein.

#### 5.1.1 Etablierung eines neuen *in vitro* Modells zur Simulation des gesamten Gastrointestinaltrakts (GIT)

Um den Einfluss eines komplexen Nahrungsmittels auf die Darmgesundheit, insbesondere auf die molekularen Mechanismen der Kolonkrebsprävention, untersuchen zu können,

musste zunächst ein *in vitro* Verdauungs- und Fermentationsmodell etabliert werden. Die Entwicklung des Modells erfolgte unter Verwendung eines Weizenvollkornmehls.

Der enzymatische Vorverdau der enthaltenen Stärke im Weizenvollkornmehl und die nachfolgende Elimination der Glukose sind entscheidend für die *in vitro* Fermentation. Lebet *et al.* (177) wiesen eine Bildung von SCFA durch die Fermentation von nicht verdauten und vorverdauten Weizenproben nach. Hierbei beobachteten sie eine höhere Konzentration der SCFA in den Fermentationsproben der nicht vorverdauten Weizenproben im Vergleich zu den verdauten Proben. Ohne vorherige Degradierung der Stärke und anschließende Beseitigung der Spaltprodukte werden die SCFA-Produktion aus den Ballaststoffen und deren funktionelle Wirkungen (z. B. chemopräventive Effekte) in Kolonozyten überlagert.

In Anlehnung an das Protokoll von Aura *et al.* (179) konnte durch die Zugabe von  $\alpha$ -Amylase zu Beginn der Mundsimulation die Stärke effektiv degradiert werden (**Publikation I**). Das Ausgangsmaterial beinhaltete keine Glukose, so dass das Vorkommen von Glukose im Retentat (zurückbleibende Probe nach Dialysevorgang während der Dünndarmsimulation, welche als Ausgangsmaterial zur Dickdarmsimulation verwendet wird) und im Dialysat (Dialysepuffer mit Spaltprodukten, die während des Dialysevorgangs übergehen) die Degradation der Stärke widerspiegelt (**Publikation I**). Die Integration des Dialyseschrittes während der Dünndarmsimulation diente insbesondere zur *in vitro* Resorption der Glukose. Die Glukose galt in diesem Zusammenhang als Referenzsubstanz für den erfolgreichen Verdau und den Dialysevorgang. So bestätigte die Zunahme dieser im Dialysat neben dem Abbau der Stärke die erfolgreiche Resorption der verdauten Stärke. Ebenso wies die Detektion der Gallensäuren im Dialysat auf einen erfolgreichen Dialysevorgang hin. Dabei waren 61-85 % der Gesamtmenge der Gallensäuren CA und DCA im Dialysat zu finden, was annähernd den physiologischen Gegebenheiten entspricht (ca. 80 % der ausgeschütteten Gallensäure werden rückresorbiert) (188).

Unter Verwendung der in Anlehnung an Aura *et al.* (179) durchgeführten Simulation des oberen Verdauungstraktes und die anschließende Fermentation der Testsubstanz mit Fäzes gesunder Spender wurden FÜ gewonnen, von denen die Fäzeskontrolle (FÜ Blank) ein besonders starkes zytotoxisches Potential in Zellkulturuntersuchungen besaß. Dieser Effekt konnte auf die in den FÜ enthaltenen Konzentrationen an CA (1562  $\mu$ M) und DCA (502  $\mu$ M), welche vor allem aus der eingebrachten Ochsen-galle während der Dünndarmsimulation resultierten, zurückgeführt werden (**Publikation I**). Auch Shiraki *et al.* bekräftigten dieses Ergebnis, indem auch sie zeigen konnten, dass bereits 100  $\mu$ M DCA zytoto-

xisch in HT29-Zellen wirken (189). Unter Berücksichtigung der Zusammensetzung der Testsubstanz (Weizenaleuron) (103) und einer täglichen Gallensäureausschüttung von 20-30 mg (190) wurde die eingesetzte Ochsen-gallekonzentration von 41,6 g/l (nach Aura et al. auf eine annähernd physiologische Konzentration (0,6 g/l) gesenkt, wodurch die starke Zytotoxizität der gewonnenen Fäzeskontrolle deutlich vermindert werden konnte. Das reduzierte zytotoxische Potential der Fäzeskontrolle (**Publikation I**) war so mit anderen Fäzeskontrollen, die allein durch die Dickdarmpassage nach Barry *et al.* (171) generiert wurden, vergleichbar (160, 186).

Weizenvollkornmehl müsste aufgrund seiner Komplexität (neben den Ballaststoffen ist u.a. Stärke enthalten) im Vergleich zu einer reinen Ballaststoffquelle ohne Vorverdau und Dialyse mehr SCFA erbringen. Die mehrmals parallel durchgeführte *in vitro* Simulation des GIT des gut charakterisierten Ballaststoffs Synergy1<sup>®</sup> und des Weizenvollkornmehls führte zur gleichen Zunahme des SCFA-Gehaltes in den FÜ (Synergy1<sup>®</sup>: 2,7-fach; Weizenvollkornmehl: 2,8fach) im Vergleich zur entsprechenden Fäzeskontrolle, was zudem mit einer Verschiebung des prozentualen Verhältnis der SCFA zugunsten des Butyrats verbunden war. Dadurch konnte die Eignung der Methode für die Anwendung komplexer Nahrungsmittel statistisch belegt werden (**Publikation I**).

Das etablierte stationäre *in vitro* System besitzt jedoch auch deutliche Grenzen. Durch mehrstufige, kontinuierliche Systeme zur GIT-Simulation können komplexe Lebensmittel oder Nahrungsbestandteile unter nahezu physiologischen Bedingungen über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Mit Hilfe des kontinuierlich ablaufenden, Computerkontrollierten TIM-Modells (172, 175) werden z. B. alle Passagen des GIT simuliert. Hierbei ist von Vorteil, dass die physiologischen Gegebenheiten (z. B. Peristaltik, pH-Werte, Enzymausschüttung, Temperatur, Absorption von Wasser, Spalt- und Fermentationsprodukten, Transitzeit) im GIT nahezu vollständig berücksichtigt werden. Das TIM-Modell wird häufig herangezogen um *in vitro* Parameter, wie die Verdauung von Nahrungsbestandteilen und vollständigen Mahlzeiten sowie das Verhalten aufgenommener Mikroorganismen und der Mikrobiota des Kolons zu bestimmen. Jedoch sind die generierten FÜ für zellkulturbasierte Untersuchung aufgrund ihrer zytotoxischer Eigenschaften nicht anwendbar (170, 178). Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte *in vitro* System besaß insbesondere den Vorteil, dass die FÜ in Zellkulturexperimenten einsetzbar waren. Des Weiteren konnte eine relativ einfache Handhabung und ein geringer Kostenaufwand erzielt werden. Trotz des Fehlens kontinuierlicher Prozesse war es möglich, mittels der etablierten *in vitro* Methode unter annähernd physiologischen Bedingungen die Abschnitte des GIT (Mund, Ma-

gen, Dünndarm, Dickdarm) zu simulieren. Insbesondere durch die Anpassung der Ochsen-gallekonzentration an physiologische Gegebenheiten und die Einführung eines Dialyse-schrittes während der Dünndarmsimulation waren nicht-zytotoxische FÜ verschiedener, komplexer Nahrungsmittel generierbar. Damit waren diese FÜ in nachfolgenden Untersu-chungen zu chemopräventiven und gesundheitsfördernden Effekten der Testsubstanzen in humanen Kolonzelllinien einsetzbar. Unter Berücksichtigung der physiologischen Bedin-gungen wird die Aussagekraft von *in vitro* Untersuchungen bezüglich krebspräventiver Eigenschaften von komplexen Nahrungsmitteln deutlich verbessert.

Die *in vitro* Fermentationsmethode wurde anschließend für die Gewinnung der FÜ von Weizenaleuron mit und ohne Zugabe der Probiotika (**Publikationen II, III**) eingesetzt.

### 5.1.2 Metabolite in den FÜ des fermentierten Aleurons

Die SCFA sind ein wesentliches Ergebnis der bakteriellen Fermentation von Ballast-stoffen im Dickdarm des Menschen. Ihnen, speziell dem Butyrat, werden verschiedene gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben (191). Erhobene Daten aus verschiede-nen Studien (91, 92, 191) zeigten, dass fäkale SCFA in der Reihenfolge Aze-tat > Propionat > Butyrat mit einem Verhältnis von annähernd 60:20:20 bis 60:25:15 ge-bildet werden. In Abhängigkeit der aufgenommenen Nahrung, wird der Gesamtgehalt der SCFA von 70-140 mM im proximalen und von 20-70 mM im distalen Kolon angegeben (91). Im FÜ der Fäzeskontrolle konnte eine Konzentration der Gesamt-SCFA von ~20 mM und ein Verhältnis der SCFA 54:23:23 detektiert werden (103). Diese Ergebnisse reflektie-ren mögliche Konzentrationen und Verhältnisse der SCFA wie sie unter den physiologi-schen Bedingungen messbar sind (91). Die Fermentation der beiden Sorten des Weizen-aleurons (EU und US) führte zu einer deutlichen Erhöhung der SCFA-Konzentrationen um das 2-3-fache im Vergleich zur Fäzeskontrolle, was sich auch in einer Absenkung des pH-Werts in den FÜ widerspiegelte. Zudem verschob sich das prozentuale Verhältnis der drei SCFA zugunsten des gesundheitsfördernden Butyrats von 54:23:23 (FÜ Blank) auf 43:15:42 durch den FÜ des EU Aleurons bzw. 43:16:41 durch den FÜ des US Aleurons.

Eine gesteigerte Bildung krebspräventiver Fermentationsmetabolite, wie den SCFA, ist an den Verzehr einer ausgewogenen Mischkost gebunden. Dahingegen resultiert eine bal-laststoffarme, fett- und proteinreiche Ernährung, die Kennzeichen der *western style diet* (90), vor allem in der Bildung tumorpromovierender Substanzen wie sekundäre Gallensäu-ren und verschiedene Stickstoffverbindungen (z. B. *N*-Nitroso-Verbindungen, Indole und

Ammoniak (10, 11, 192). Besonders die sekundäre Gallensäure DCA ist für ihre krebsfördernden Eigenschaften bekannt, da sie zytotoxisch und genotoxisch auf die Darmepithelzellen wirkt und damit als Tumorinitiator und -promotor gilt (105, 193, 194). Durch die Fermentation des Aleurons wurde die Konzentration der DCA in den FÜ des Aleurons im Vergleich zur Fäzeskontrolle um 70-90 % reduziert (103). Die Reduktion ist vermutlich eine Konsequenz der SCFA-Produktion und der damit verbundenen pH-Wert-Senkung (103), da so die Aktivität bakterieller Enzyme, wie der 7 $\alpha$ -Dehydroxylase, gehemmt und die Bildung der DCA aus der CA unterdrückt werden könnte (102, 195). Ebenso ist eine erhöhte direkte Bindung beider Gallensäuren an die Arabinoxylane des Aleurons für die Absenkung der Konzentration der DCA denkbar (196).

Die proteolytische Spaltung von unverdaulichem Protein durch die Darmflora führt zur Bildung von Ammoniak, welches über die Stimulierung der Proliferation entarteter Zellen die Karzinogenese begünstigt (197). Verschiedene Studien belegen, dass in Gegenwart von Ballaststoffen die luminale Ammoniakkonzentration abnimmt (198-200). Diese Beobachtung ist vermutlich auf die Rolle der Ballaststoffe als Substrat für das Wachstum der Darmbakterien zurückzuführen. So wird Stickstoff in das bakterielle Gerüstprotein eingebaut und in dieser Form aus dem Darm ausgeschieden, was letztendlich zur genannten Abnahme führt (201). Darüber hinaus kann die mit der Verstoffwechselung der Ballaststoffe einhergehende pH-Wert-Senkung die Aktivität verschiedener Enzyme (z. B. Aminosäure-Decarboxylase) vermindern und so zur Reduktion der Bildung stickstoffhaltiger Verbindungen beitragen (202). In den eigenen Untersuchungen zeigte sich im Vergleich zur entsprechenden Fäzeskontrolle keine Verminderung des Ammoniakgehaltes nach bakterieller Fermentation des Aleurons (103). Vielmehr konnte eine erhöhte Konzentration des Ammoniaks in den FÜ beider Aleuronsorten nachgewiesen werden, wobei diese mit dem Proteingehalt des Weizenaleurons assoziiert war.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass durch die bakterielle Fermentation von Weizenaleuron die Bildung der gesundheitsfördernden SCFA gefördert und die Produktion der tumorpromovierenden sekundären Gallensäure DCA gehemmt wird.

### 5.1.3 Einfluss von Probiotika LGG<sup>®</sup> /Bb12 und *Clostridium butyricum* auf die Bildung verschiedener Fermentationsmetabolite

Für Probiotika werden vielfältige Mechanismen beschrieben, über welche sie protektiv in den Prozess der Kolonkarzinogenese einwirken könnten (121, 130). Die Modulation des



Mikrobiotaprofils, die Bildung gesundheitsfördernder Substanzen und die Hemmung der Produktion gesundheitsschädigender Substanzen sind drei der diskutierten Mechanismen.

Die Untersuchungen dieser Arbeit sollten daher Aufschluss darüber geben, ob die Fermentation des Aleurons durch die Probiotika LGG<sup>®</sup>/Bb12 und den *Clostridium butyricum* beeinflusst und die Bildung der gesundheitsfördernden SCFA, der tumorpromovierenden DCA und des zytotoxischen Ammoniaks verändert werden. Um aussagekräftige Ergebnisse zu generieren, wurde in einer neuen Fermentationsserie (Fermentation II) wiederholt Aleuron allein (ohne LGG<sup>®</sup>/Bb12 und *Clostridium butyricum*) mitgeführt. Da das Fäzes-Inokulum für jede Fermentationsserie (I und II) aus verschiedenen Spendern hergestellt wurde und sich diese vermutlich voneinander unterscheiden, konnte dadurch ein adäquater Vergleich innerhalb der Proben von Fermentation II gewährleistet werden.

Durch die neuen Experimente wurden die Bildung der SCFA und die Verschiebung des SCFA-Verhältnisses zugunsten des Butyrats durch die alleinige bakterielle Fermentation des Aleurons (FÜ Aleuron –) (203) bestätigt. Entsprechend der Fermentation I (siehe Kapitel 5.1.2) (103) war die Zunahme der SCFA gleichzeitig mit einer Abnahme des pH-Wertes assoziiert, was als Folge des bakteriellen Abbaus der Ballaststoffe im Aleuron anzunehmen ist.

Die Effizienz der Fermentation von Aleuron konnte durch die Zugabe der Probiotika LGG<sup>®</sup>/Bb12 (FÜ Aleuron +) leicht gesteigert werden, was sich in einer 1,2-fach höheren Butyratkonzentration im Vergleich zu FÜ Aleuron – widerspiegelte (203). Auch eine zusätzliche Zugabe des *Clostridium butyricums* steigerte die Konzentration im FÜ Aleuron – deutlich (1,3-fache). Darüber hinaus waren die Probiotika allein (FÜ Blank +) in der Lage, SCFA zu produzieren. Diese Ergebnisse verweisen auf die Fähigkeit der Probiotika LGG<sup>®</sup>/Bb12 die unverdaulichen Bestandteile des Aleurons und des Fäzes-Inokulums zu metabolisieren, wie es bereits durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte (162, 164, 204). Eine zusätzliche Erniedrigung des pH-Wertes im FÜ Aleuron + (pH 5,45) im Vergleich zum FÜ Aleuron – (pH 5,70) war vermutlich zum einen in der leicht erhöhten Bildung der SCFA begründet und zum anderen auf das erhöhte Wachstum azidophiler Bakterien (siehe Kapitel 5.4) zurückzuführen. Diese Darmbakterien sind in der Lage, vorrangig Laktat und Azetat zu bilden, wobei beide Säuren wiederum durch butyratbildene Bakterien (z. B. Gattungen der *Roseburia* und *Faecalibacteria* (205)) zu Butyrat metabolisiert werden. Über letztgenannten Mechanismus könnten die Probiotika indirekt eine erhöhte Butyratbildung vermitteln (206). Ein Beleg dafür lieferte die alleinige Fermentation des Aleurons mit LGG<sup>®</sup>/Bb12 ohne Zugabe des Fäzes-Inokulums. Die Probiotika waren

selbst nicht in der Lage, Butyrat zu bilden. Erst die Zugabe des *Clostridium butyricum* äußerte sich in einer geringen Butyratbildung. Demzufolge kann angenommen werden, dass *Clostridium butyricum* die Stoffwechselprodukte der azidophilen Bakterien des Darms und der Probiotika LGG®/Bb12 zu Butyrat verstoffwechseln konnte.

Bereits Untersuchungen von Borowicki *et al.* ergaben eine Erniedrigung der DCA-Konzentration durch Fermentation von Aleuron. Dabei wurde vermutet, dass dieser Effekt aus der Zunahme der SCFA und der Abnahme des pH-Wertes resultierte (103). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die früheren Befunde und zeigten, dass durch die Fermentation des Aleurons (FÜ Aleuron –) die DCA-Menge gegenüber der entsprechenden Fäzeskontrolle (FÜ Blank –) um über 84 % erniedrigt wurde (**Publikation III**). Interessanterweise wurde der Effekt durch die Zugabe von LGG®/Bb12 noch weiter begünstigt, was auf synergistische Effekte des Aleurons mit diesen Probiotika hinweist. Sogar in den FÜ aus der bakteriellen Fermentation allein mit den Probiotika (FÜ Blank +) war die DCA-Mengen um 76 % reduziert. Außerdem konnte für die Probiotika gezeigt werden, dass sie nicht an der Umwandlung der primären Gallensäure CA in die tumorpromovierende sekundäre Gallensäure DCA beteiligt sind. So konnte im FÜ, welcher durch die alleinige Fermentation der Probiotika ohne Zugabe des Fäzes-Inokulums generiert wurde, nur die CA detektiert werden. Generell könnte die Senkung des DCA-Gehaltes vermutlich auf die SCFA-Bildung zurückzuführen sein. Die damit verbundene pH-Wert-Erniedrigung kann womöglich zur Verminderung der Aktivität der 7 $\alpha$ -Dehydroxylase führen (102, 195). Darüber hinaus könnte die Reduktion des pH-Wertes in einer Verschiebung der Zusammensetzung der Mikrobiota zugunsten gesundheitsfördernder Bakterien resultieren. Dies kann auch zur Reduktion von Aktivitäten anderer Enzyme (z. B. die  $\beta$ -Glukuronidase und Nitroreduktase) führen, die in die Bildung von Kanzerogenen involviert sind (102). Ein weiterer Grund für die Erniedrigung des DCA-Gehaltes könnte sein, dass die DCA durch die Probiotika gebunden wurde. So ist bekannt, dass Probiotika und azidophile Bakterien Gallensäuren über die Bildung von Membranpolysacchariden direkt binden (207) und demzufolge die Senkung des DCA-Gehaltes im Darm vermitteln. Natürlich können ebenso die Ballaststoffe des Aleurons, die so genannten Arabinoxylane, durch eine direkte Bindung der Gallensäuren zur Verminderung der Konzentration beitragen (196).

Die Untersuchungen zeigten eine höhere Konzentration an Ammoniak im FÜ des fermentierten Aleurons (FÜ Aleuron –) im Vergleich zur entsprechenden Fäzeskontrolle (FÜ Blank –) (**Publikation III**). Dieses Ergebnis zeigt, dass durch das Aleuron nicht nur Ballaststoffe sondern auch Protein eingebracht und verstoffwechselt wurde, wie es bereits in

einer früheren Studien von Borowicki *et al.* zu beobachtet war (103). Durch die gemeinsame Fermentation des Aleurons mit LGG<sup>®</sup>/Bb12 wurde dieser Ammoniakgehalt um etwa 10 % vermindert (**Publikation III**). Eine Senkung des Ammoniakgehaltes um ca. 56 % wurde schon von Sakata *et al.* nach einer „one-batch“-Fermentation mit diversen Probiotika beschrieben (208). Andere Studien belegten in Gegenwart unverdaulicher Kohlenhydrate eine Minderung der fäkalen Ammoniakkonzentration (198-200). Vilek diskutierte, dass diese das Wachstum einzelner Bakterien des Dickdarms stimulieren, welche nicht verdautes Protein und daraus resultierend Metabolite für ihren Stoffwechsel und ihr Wachstum verwenden (209). Daraus ergibt sich die Erniedrigung von Stickstoffverbindungen („*nitrogen sinks*“) im Darm wie beispielsweise Ammoniak.

## 5.2 Effekte des FÜ von fermentiertem Aleuron in humanen Kolonozyten (Fermentation I)

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte geklärt werden, ob aus einer Fermentation von EU und US Weizenaleuron gewonnene FÜ ein chemopräventives Potential in humanen Kolonzellen aufweisen.

### 5.2.1 Modulation der Genexpression in humanen Kolonzellen

Ein wesentlicher Mechanismus der primären Chemoprävention von Dickdarmkrebs besteht in der Induktion von Entgiftungsenzymen in den Kolonozyten, wodurch ein erhöhter Zellschutz gegenüber reaktiven, kanzerogenen Verbindungen hervorgerufen wird (96). Für Weizenkleie, welche die Aleuronschicht beinhaltet, liegen mehrere Studien vor, in denen krebspräventive Eigenschaften gezeigt werden. Lupton und Turner sowie Ferguson und Harris fassten in jeweils einem Übersichtsartikel viele epidemiologische und experimentelle Studien zu den möglichen protektiven Effekten der Weizenkleie zusammen (151, 152). Bis heute existierten jedoch mit der Ausnahme einer Rattenstudie weder *in vitro* noch *in vivo* Studien zum chemopräventiven Potential von isoliertem Weizenaleuron. McIntosh *et al.* konnten in einer Studie mit Ratten eine Reduktion AOM-induzierter Adenome im Kolon nach Gabe von Weizenaleuron nachweisen. Hierbei korrelierten die Butyratkonzentration und die Aktivität der bakteriellen  $\beta$ -Glucuronidase invers mit dem Auftreten der Adenome (149).

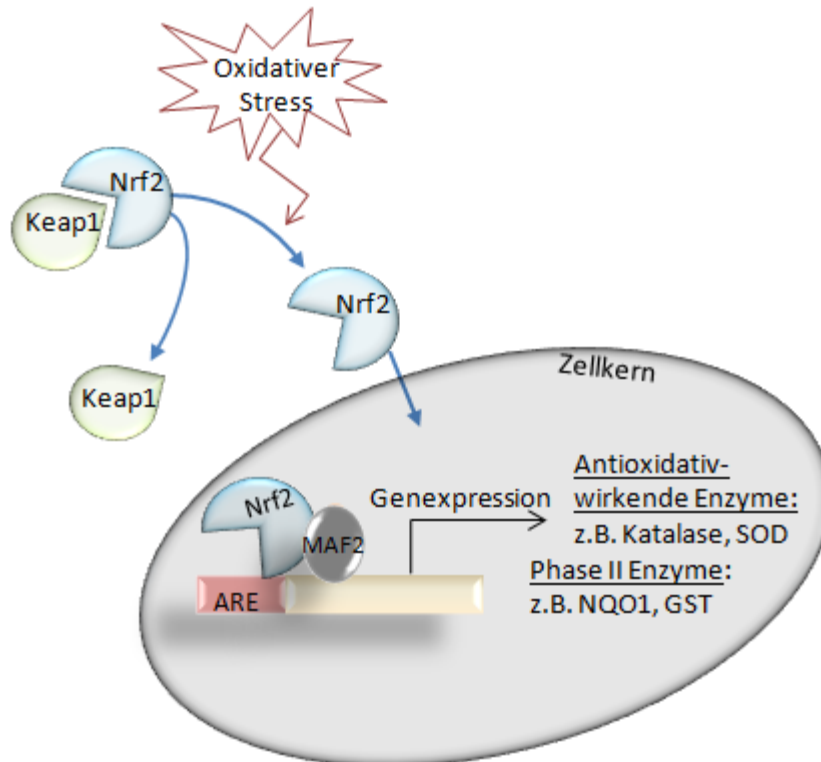
Zum Nachweis des chemopräventiven Potentials von Weizenaleuron wurde zunächst ein Custom cDNA-Microarray mit HT29-Zellen durchgeführt. Damit wurde der Einfluss des fermentierten EU Aleurons (10 % FÜ) auf ein breites Spektrum von Genen erfasst

(**Publikation II**). Dieser Array berücksichtigte 300 Gene, welche in die Karzinogenese involviert sind, sowie 6 Haushaltsgene (210). Die Auswertung des Arrays machte deutlich, dass 10 der Gene um mehr als das 1,5-fache nach Vorbehandlung (24 h) mit dem fermentierten Aleuron hochreguliert worden, wobei die Fäzeskontrolle keinen Effekt aufwies (**Publikation II**). Die regulierten Gene sind in Schlüsselprozesse des *Phase-I*- und *Phase-II*-Metabolismus sowie in der Stressabwehr, Signaltransduktion und Zellzyklusregulation involviert. Mit einer Ausnahme von wenigen *in vitro* Studien (160, 178, 187, 211, 212) waren Untersuchungen zum Einfluss von komplexen Fermentationsproben auf Marker der Primärprävention kein Gegenstand von *in vitro* Studien. Aus Sicht der Primärprävention erwiesen sich vier der modulierten Gene von besonderem Interesse. Dabei handelt sich um Gene, die an der Entgiftung von Fremdstoffen (*GSTP1* (Glutathion S-Transferase Pi 1) und *SULT2B1* (zytosolische Sulfotransferase 2B1) und deren Regulation (*MAF2* (Transkriptionsfaktor MAF (Protoonkogen c-MAF)) sowie an der Stressantwort (*Katalase*) beteiligt sind. Die *Katalase* war das am stärksten durch FÜ Aleuron induzierte Gen mit einer 5,2-fachen Hochregulation. *MAF2* wurde 4,7-fach und *SULT2B1* 4,4-fachen erhöht. Die *GSTP1*-Regulation (1,4-fach) deutete sich nur tendenziell an. Trotzdem wurde die *GSTP1*, als Hauptisoform der GST im Dickdarm (51, 57), in weitere Untersuchungen eingeschlossen, um deren besondere Relevanz zu berücksichtigen.

Die Expression zahlreicher Gene, die in die Entgiftung und Inaktivierung von Kanzerogenen involviert sind, wird über spezifische Sequenzen innerhalb ihrer Promotor-Region reguliert. Daher könnte eine Aktivierung des Promotors möglicherweise durch Butyrat die Ursache der erhöhten Expression aufgeführter Gene sein. Die Genexpression der *Phase-II*-Enzyme wird häufig durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 gesteuert. In Gegenwart von Elektrophilen und oxidativem Stress dissoziiert Nrf2 von seinem zytosolischen Inhibitor Keap1, transloziert zum Nukleus, bildet daraufhin ein Heterodimer mit anderen bZIP Transkriptionsfaktoren wie *MAF2* und bindet anschließend an *Antioxidative Response Elements* (ARE) in der Promotorregion der Zielgene (213, 214). In Folge wird die Aktivierung der Transkription verschiedener Entgiftungsenzyme (z. B. *GSTP1*, SOD und *Katalase*) ausgelöst und so die zelluläre Abwehr erhöht (Abb. 6) (215, 216). Bisher wurden speziell Isothiocyanate und Flavonoide als chemopräventiv-wirkende Pflanzenstoffe beschrieben (216). Diese aktivieren die Expression von Genen der *Phase II*-Enzyme und antioxidativ wirkenden Enzymen über den durch Phosphorylierung und/oder Redox-Modifikation-vermittelten Nrf2-ARE-Signalweg (217). So ist denkbar, dass durch die Inkubation der Kolonozyten mit dem FÜ Aleuron erzielte Expressionssteigerung von *MAF2*

(4,7-fach) möglicherweise für die Zunahme *GSTP1*- und *Katalase*-Expression verantwortlich war (**Publikation II**). Jedoch sollten weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung des zugrundeliegenden Signalweges erwogen werden, da spezifisch für die Wirkung der komplexen FÜ bislang keine Mechanismen beschrieben wurden.

Abb. 6 Nrf2-vermittelte Regulation der Genexpression verschiedener Enzyme (modifiziert nach



(213, 216)). ARE, Antioxidant responsive element; GST, Glutathion-S-Transferasen; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; MAF2, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog; NQO1, NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase; Nrf2, Nuclear factor-E2-related factor 2; SULT, Sulfotransferasen; UGT, UDP-Glucuronosyltransferasen.

Die in den Array-Untersuchungen beobachteten Effekte

wurden hinsichtlich der Genexpression von *GSTP1*, *Katalase* und *SULT2B1* mittels *real-time qPCR* in HT29-Zellen verifiziert. Die Expression dieser Gene (*GSTP1*, *Katalase*, *SULT2B1*) erhöhte sich durch die Inkubation mit den FÜ Aleuron (EU und US) um mehr als das 1,5-fache im Vergleich zur Mediumkontrolle. Dabei wies die Fäzeskontrolle für die Expression der *GSTP1* und *Katalase* keine Wirkung auf (**Publikation II**). Jedoch zeigte die Fäzeskontrolle eine starke Induktion der *SULT2B1*-Expression in HT29-Zellen, welche zudem signifikant deutlich höher ausfiel als die des fermentierten Aleurons (**Publikation II**). Saini *et al.* berichteten über die essentielle Rolle der SULT-vermittelten Sulfonierung im Entgiftungsprozess der Gallensäuren (64). So ist anzunehmen, dass die höhere Expres-

sion der *SULT2B1* durch die Fäzeskontrolle aus der höheren Konzentrationen an Gallensäuren (CA und DCA) im Vergleich zum FÜ des Aleurons resultierte. Die Induktion der *SULT2B1* könnte so zu einer erhöhten Metabolisierung der tumorpromovierenden DCA führen.

Die Regulierung vieler *Phase-II*-Enzyme durch die Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren Nrf2 und MAF2 und anschließender Bindung am ARE des Zielgens, scheint für die SULT-Aktivierung nicht von Bedeutung zu sein. So wäre zu erwarten, dass die gezeigte Steigerung der *MAF2*-Expression (**Publikation II**) durch das fermentierte Aleuron mit einer im Vergleich zur Fäzeskontrolle höheren Expression der *SULT2B1* verbunden ist. Trotz des Einflusses der SULT auf viele verschiedene, biologische Prozesse (siehe Kapitel 1.3.2.2) ist bisher wenig über deren tatsächlichen regulatorischen Signalweg bekannt.

HT29-Zellen werden häufig als Modell für epitheliale Kolonzellen und zur ersten Abschätzung chemopräventiver Eigenschaften von Substanzen eingesetzt (100, 103, 218, 219), da sie als stabile Zelllinie angesehen werden und eine gute Praktikabilität aufweisen (220). Ungeachtet dessen sind HT29-Zellen stark transformiert (220) und daher im Rahmen der Untersuchungen zur Primärprävention nicht als ideal einzuschätzen. Untersuchungen an nicht-transformierten Zellen sind von besonderer Bedeutung, da sie ermöglichen, die zugrundeliegenden Mechanismen der Primärprävention näher zu beleuchten. Eine Induktion der Expression/Aktivität von Entgiftungsenzymen ist in diesen Zellen wichtig, um die noch teilungsfähigen Stammzellen vor genetischen Veränderungen, aber auch ausdifferenzierte Tochterzellen vor Mutation zu schützen (221). Daher bestand die Notwendigkeit, primäre nicht-transformierte Kolonozyten einzusetzen. Nachteile für die Verwendung dieses Zellmodells stellen jedoch die begrenzte Lebensdauer und relativ geringe Verfügbarkeit dar. So war es notwendig, im Vergleich zu einer Inkubationsdauer von 24 h in HT29-Zellen die Genexpressionsuntersuchungen mit einer auf 10 h verkürzten Inkubationsdauer durchzuführen, da nach dieser Zeit noch ausreichend vitale Zellen vorzufinden waren (**Publikation II**). Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der Gewebeproben wurden die Untersuchungen in den daraus isolierten Epithelstreifen zur Genexpression nur auf die beiden Gene *GSTP1* und *Katalase* beschränkt.

Die *GSTP1* ist ein *Phase II*-Enzym mit einem hohen Entgiftungspotential gegenüber elektrophilen Kanzerogenen, u. a. gegenüber dem ultimativen, krebserregenden Metaboliten des Benzo[a]pyrens (59). Eine erhöhte Synthese/Aktivität der *GSTP1* kann präventiv der zellulären Akkumulation von toxischen Substanzen entgegenwirken (222). In den Primärzellen war eine signifikante Induktion der *GSTP1*-Expression durch die Inkubation mit

10 und 20 % fermentiertem Aleuron erkennbar (10 % FÜ: 1,6-fach; 20 % FÜ: 1,8-fach). Zudem wurde eine gesteigerte *GSTP1*-Expression (1,5-fach) auch durch die Inkubation mit 20 % der Fäzeskontrolle gemessen (**Publikation II**). Dieser Effekt weist auf den Einfluss von bisher nicht identifizierten Inhaltsstoffen der Fäzesmatrix hin. Insbesondere Butyrat hat ein großes biologisches Potential. So wiesen Pool-Zobel *et al.* sowohl in gesunden als auch in transformierten Kolonzellen eine zunehmende Expression verschiedener GST-Isoformen nach einer Inkubation mit dieser SCFA nach (223). Hierbei führten sie auf, dass die Primärzellen besonders für die Aufklärung präventiver Mechanismen in der frühen Phase (Initiation) der Krebsentstehung einsetzbar sind, da in diesen Zellen die Induktion der GST mit einer gesteigerten Entgiftung von Fremdstoffen assoziiert ist (223). Dahingegen würde die funktionelle Induktion der GST in entarteten Kolonzellen *in vivo* eine verminderte Ansprechbarkeit auf chemotherapeutische Medikamente mit sich bringen. Jedoch ist zu vermuten, dass hohe Konzentrationen an Butyrat (10-20 mM) *in vivo* das Tumorzellwachstum beeinflussen noch bevor die GSTs induziert werden (223).

In gesunden Primärzellen blieb eine signifikant erhöhte Induktion der *Katalase* nach erfolgter Inkubation mit fermentiertem Aleuron aus (**Publikation II**). Die Untersuchungen zeigten eine interindividuelle Variabilität im Expressionsniveau der *Katalase*. Da die isolierten Epithelstreifen gesundem humanem Dickdarmgewebe verschiedener Patienten entstammten, verweist dieses Ergebnis auf eine unterschiedliche Sensitivität der Spender gegenüber der Inkubation mit dem fermentierten Aleuron.

### 5.2.2 Modulation der Enzymaktivitäten der GST und Katalase in humanen Kolonzellen

Um Informationen zu erhalten, inwieweit eine erhöhte Genexpression der *GSTP1* und der *Katalase* tatsächlich funktionelle Auswirkungen hat, wurden die Aktivitäten beider Enzyme erfasst.

Nach 48 und 72 h waren eine gesteigerte GST-Gesamtaktivität (2-fach) und Enzymaktivität der *Katalase* (3-4-fach) durch die Inkubation mit fermentiertem Aleuron (EU und US) in HT29-Zellen zu beobachten (**Publikation II**), was die erhöhte Genexpression der *Katalase* und *GSTP1* nach 24 h reflektiert. Zudem zeigte sich durch die Verwendung der synthetisch hergestellten SCFA-Gemische und des Butyrates als Einzelsubstanz, dass die SCFA, speziell Butyrat, teilweise zur Aktivitätsinduktion beider Enzyme beigetragen haben (**Publikation II**). Glei *et al.* beschrieben eine Induktion der Enzymaktivität der GST



durch einen komplexen FÜ von Arabinoxylanen hauptsächlich dem enthaltenen Butyrat zu (160). Andere Veröffentlichungen demonstrierten eine Induktion der GST-Gesamtaktivität (1,4-1,8-fach) durch 4 mM Butyrat in humanen Kolonkrebszellen (100, 224). Trotz wesentlich geringeren Butyratkonzentrationen in den eingesetzten 10 % des FÜ von EU Aleuron (2,0 mM) und US Aleuron (2,4 mM) war eine höhere Induktion der Enzymaktivität der GST zu beobachten. Demnach deutet sich eine Interaktion des Butyrats mit anderen in den FÜ vorkommenden Metaboliten an, die an der Aktivitätssteigerung beteiligt waren. So könnte die im FÜ vorkommende Ferulasäure an der Induktion der GST-Gesamtaktivität beteiligt sein, wie es bereits in einer Übersichtsartikel von Ramos (225) für die Chlorogensäure aufgeführt wurde.

Für die Übertragbarkeit der Befunde an Krebszellen ist die Verwendung primärer Kolonzellen als ein gesundes Zellmodell zur Erfassung primärpräventiver Mechanismen als geeignet einzustufen, so dass diese ebenso für Untersuchungen zur Enzymaktivität eingesetzt wurden. Eine signifikante Steigerung der GST-Gesamtaktivität (1,1-fach) konnte ebenso in den Primärzellen durch die Inkubation mit fermentiertem EU Aleuron erzielt werden, wobei auch die Behandlung mit der Fäzeskontrolle die enzymatische Aktivität erhöhte (**Publikation II**). Ursache für die relativ geringe Steigerung der GST durch fermentiertes Aleuron könnte sein, dass die Inkubationszeit (10 h) zu kurz war, um eine eindeutige Änderung in der Proteinexpression als Basis für die Aktivität nachzuweisen. Zukünftige Untersuchungen mit längerer Inkubationszeit könnten den Effekt verstärken. Dabei stellt die Überlebenszeit der Primärzellen den limitierenden Faktor für diese Untersuchungen dar. Daher ist es erforderlich, die Kultivierung der Primärzellen in Form von Epithelstreifen zu verbessern, um Enzymaktivitäten und darüber hinaus weitere chemopräventive Effekte von Nahrungsbestandteilen über einen längeren Zeitraum besser erfassen zu können.

Derzeit sind weder *in vitro* noch *in vivo* Studien bekannt, die Informationen zum Einfluss komplexer Fermentationsproben auf die Aktivität der Katalase geben. Bisher gibt es nur Hinweise zum Einfluss von Butyrat auf die Enzymaktivität dieses Enzyms. So zeigten Sauer *et al.* die Induktion der Katalaseaktivität in primären Kolonozyten nach Behandlung mit 10 mM Butyrat (226). Hinzu kommt eine Rattenstudie von Yano & Tierney, in der eine Butyrat-induzierte Enzymaktivitätserhöhung der Katalase nachweisbar war, welche jedoch in den glatten Muskelzellen der Lungenarterien beobachtet wurde (227). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde zum ersten Mal eine Induktion der Katalase durch den komplexen FÜ des Aleurons in HT29-Zellen beschrieben, wobei das enthaltene

Butyrat nur partiell verantwortlich war (**Publikation II**). Möglicherweise war die Mischung verschiedener biologisch aktiver Stoffe, z. B. Ferulasäure, Sinapinsäure und Kaffeesäure (228) im komplexen FÜ neben den SCFA verantwortlich.

Obwohl eine erhöhte Genexpression der Katalase in den Primärzellen nicht beobachtet werden konnte, zeigte sich eine Induktion der Enzymaktivität durch fermentiertes Aleuron (10 %) (**Publikation II**), was zu einer verbesserten Entgiftung von  $H_2O_2$  in den Zellen führen kann. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass post-translationale Modifikationen (z. B. Phosphorylierung) in der Regulation der Enzymaktivität der Katalase involviert sind. Eine durch die Fäzeskontrolle vermittelte erhöhte Enzymaktivität der Katalase weist ebenso auf den Einfluss weiterer bisher nicht identifizierter Fermentationsmetabolite hin (229).

Außerdem trug die Empfindlichkeit der Gewebespender gegenüber den Inkubationen maßgebend zu den beobachteten Resultaten bei (**Publikation II**) – in drei Proben wurde die Aktivität der analysierten Enzyme induziert, wohingegen in drei weiteren Geweben keine Effekte ersichtlich waren.

### 5.2.3 Schutz gegenüber oxidativem Stress – antigenotoxische Eigenschaften in Kolonzellen

Um Informationen zu erlangen, ob die positive Modulation der Genexpression und Enzymaktivität mit einer Reduktion oxidativer DNA-Schäden assoziiert ist, wurde hierzu das antigenotoxische Potential des fermentierten Aleurons untersucht. Die Induktion oxidativer DNA-Schäden wurde durch  $H_2O_2$  vermittelt, welches das Substrat der Katalase, aber auch einiger GSTs ist (68, 72, 230). Die Behandlung der HT29-Zellen (48 h) mit den komplexen Fermentationsproben des Aleurons (EU und US; 5 und 10 %) hatten eine Reduktion von  $H_2O_2$ -induzierten DNA-Schäden zur Folge (**Publikation II**). Allerdings resultierte auch die Inkubation der Zellen mit der Fäzeskontrolle in einer ähnlichen Reduktion der DNA-Schäden. Dieser Effekt weist auf weitere Metabolite mit antioxidativem Potential in der Fäzeskontrolle hin. Gleit *et al.* bekräftigten diese Annahme, indem auch sie neben fermentierten Arabinoxylanen der Weizenkleie antigenotoxische Effekte der Fäzeskontrolle in HT29-Zellen beobachteten (160). Um involvierte, potentiell genotoxische Substanzen identifizieren zu können, müssen die analytischen Untersuchungen erweitert werden.

Die Induktion der Genexpression und Enzymaktivität der GST und Katalase durch fermentiertes Aleuron könnte eine Erklärung für dessen Wirkung liefern (**Publikation II**). Darüber hinaus könnten direkte antioxidative Effekte und/oder Einflüsse auf DNA-

Reparaturmechanismen während der Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 min, 37 °C) eine denkbare Erklärung für die nachgewiesene Antigenotoxizität der Testsubstanzen liefern (94, 231).

### 5.3 Effekte der FÜ von fermentiertem Aleuron mit/ohne Zugabe der Probiotika LGG<sup>®</sup>/Bb12 in humanen Kolonozyten (Fermentation II)

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte geklärt werden, ob FÜ gewonnen aus einer Kofermentation von EU Weizenaleuron und Probiotika LGG<sup>®</sup>/Bb12 ein chemopräventives Potential in humanen Kolonzellen besitzen. Zudem war von Interesse, inwieweit die Zugabe dieser Probiotika einen vom FÜ Aleuron allein induzierten Effekt begünstigen könnte. Dadurch sollte ein möglicher Zusatznutzen durch die Probiotika erfasst werden (**Publikation III**).

#### 5.3.1 Modulation der Genexpression in humanen Kolonozyten

Um der Karzinogenese in den frühen Stadien (Initiation, Promotion) ihres Verlaufs möglicherweise entgegenzuwirken, ist eine Induktion von Enzymen der Abwehr potentiell kanzerogener Substanzen von Bedeutung. Bisher waren komplexe Fermentationsproben aus Ballaststoffquellen kombiniert mit Probiotika eher selten Gegenstand von *in vitro* Studien, in denen die Bestimmung molekularer Mechanismen der Primärprävention im Fokus stand.

Die Untersuchungen zeigten eine signifikante Induktion der *GSTP1*-Expression in HT29-Zellen durch FÜ Aleuron – und FÜ Aleuron + in vergleichbarer Intensität (2-2,5-fach), so dass die LGG<sup>®</sup>/Bb12 keinen Zusatznutzen erbrachten (**Publikation III**). Das Ausbleiben eines möglichen Zusatzeffektes durch die Probiotika (**Publikation III**) könnte auf die annähernd gleichen Konzentrationen von Butyrat in den eingesetzten 10 % der FÜ (FÜ Aleuron –: 2,4 mM, FÜ Aleuron +: 3,0 mM (203)) zurückzuführen sein. Für die entsprechenden Fäzeskontrollen (FÜ Blank ±) waren keine Effekte zu sehen. Der von der Fermentationsprobe mit Aleuron ausgehende Effekt entsprach der Induktion durch den FÜ Aleuron der Fermentation I (**Publikation II**).

Des Weiteren wurde ebenso in gesunden, humanen Kolonzellen das chemopräventive Potential der Fermentationsproben untersucht. Dadurch konnten erste Hinweise erlangt werden, inwieweit Weizenaleuron und/oder LGG<sup>®</sup>/Bb12 (FÜ Aleuron ±) in der Lage sind, primärpräventiv in den Zielzellen der Karzinogenese zu wirken. Die Induktion der *GSTP1* (>1,5-fach) konnte sowohl durch FÜ Aleuron – als auch durch FÜ Aleuron + gezeigt werden, wobei die Probiotika auch in diesem Zellmodell keinen zusätzlichen Nutzen erbrach-

ten (**Publikation III**). Auch hier könnten wiederum die annähernd gleichen Butyratkonzentrationen der FÜ eine Erklärung liefern. Erstaunlicherweise zeigten Probiotika allein (FÜ Blank +) einen vergleichbaren Effekt. Wie auch von verschiedenen anderen Gruppen postuliert, spielen hier wahrscheinlich ebenfalls bisher undefinierte Metabolite in der Fäzesmatrix eine Rolle (z. B. Phenolsäuren) (88, 229).

Derzeit sind weder *in vitro* noch *in vivo* Daten zur Wirksamkeit von komplexen Fermentationsproben hinsichtlich der Katalase verfügbar. Die Expression der Katalase war bereits allein durch die Probiotika (FÜ Blank +) in HT29-Zellen (1,8-fach) tendenziell induzierbar (**Publikation III**). Interessanterweise zeigten FÜ Aleuron – (2,1-fach) und FÜ Aleuron + (1,9-fach) vergleichbare, jedoch nicht als signifikant belegbare, Effekte, was auf eine ähnliche Zusammensetzung der komplexen FÜ hinweisen könnte.

In humanen Primärzellen war keine Modulation der Expression der *Katalase* durch die Testsubstanzen zu beobachten, wobei dieses Ergebnis mit der kurzen Inkubationszeit (Primärzellen: 10 h, HT29-Zellen: 24 h) und einer zu geringen Anzahl von Gewebespendern (6) zusammenhängen könnte (**Publikation III**). Erste, noch unveröffentlichte Untersuchungen von Jahns *et al.* unter Verwendung längerer Inkubationszeiten (12 h) und mehreren Gewebespendern (10-13) ergab eine Induktion der *Katalase*-Expression in Primärzellen nach Butyrat-Behandlung (10 mM).

Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass aufgrund interindividueller Variationen (z. B. genetische Ausstattung (Polymorphismen (232)), Ernährungsgewohnheiten und Zusammensetzung der Dickdarmflora (233)) die Spender nicht einheitlich auf eine Inkubation ansprechen. Daher sind möglicherweise große Differenzen in der zellulären Empfindlichkeit gegenüber Fremdstoffen zwischen den Spendern zu erwarten. Darüber hinaus könnte durch eine Erhöhung der Spenderanzahl die interindividuellen Variationen ausgeglichen werden.

Während der FÜ von Aleuron allein die Genexpression (2,8-fach) der *SULT2B1* in HT29-Zellen beeinflusste, war für die Fermentationsprobe von Aleuron mit den Probiotika dieser Effekt nicht nachzuweisen (**Publikation III**). Für beide Fäzeskontrollen (mit/ohne LGG<sup>®</sup>/Bb12) konnte eine Erhöhung der *SULT2B1*-Genexpression beobachtet werden. Gallensäuren sind ein Substrat der hydroxysteroiden SULT2B (61). So könnte der hohe Gehalt der DCA im FÜ Blank – (30,70 µM) (**Publikation III**) im Vergleich zum FÜ Aleuron – eine mögliche Erklärung für die höhere Induktionsrate liefern (siehe in Kapitel 5.2.1). Für die Induktion durch den FÜ Aleuron – wäre annehmbar, dass eine Wirkung ebenso vom Fermentationsmetaboliten Butyrat ausgehen kann. Bisher sind jedoch keine *in vitro* und *in*

*vivo* Studien bekannt, die den Einfluss einfacher sowie komplexer Fermentationsproben auf die *SULT2B1*-Expression untersuchen. Demzufolge sind weitere Studien nötig, um die zugrundeliegenden Mechanismen für die Regulation durch FÜ aufzuklären. Insgesamt könnte die induzierte Genexpression der *SULT2B1* in einer höheren enzymatischen Aktivität resultieren. Damit wäre ein verstärkter Abbau der tumorpromovierenden DCA assoziiert, worüber die *SULT2B1* hemmend in die frühen Phasen der Krebsentstehung einwirken könnte.

Aufgrund der geringen Probenmenge der Gewebestücke und der begrenzten Verfügbarkeit der Gewebeproben waren Untersuchungen zur Genexpression der *SULT2B1* bisher nicht in den Primärzellen durchführbar. Befunde aus der Literatur liegen nicht vor.

### 5.3.2 *Modulation der Enzymaktivitäten in humanen Kolonozyten*

Um Informationen zu erhalten, inwieweit eine erhöhte Genexpression der *GSTP1* und der *Katalase* funktionelle Auswirkungen mit sich bringt und die Probiotika hierbei einen Zusatznutzen leisten, wurden die Aktivitäten der Enzyme beider Gene bestimmt. Vergleichbar mit Fermentation I (**Publikation II**) war über den Zeitraum von 24-72 h nach der Inkubation der HT29-Zellen mit fermentiertem Aleuron (FÜ Aleuron –) eine gesteigerte Enzymaktivität der GST (3-fach) zu beobachten (**Publikation III**). Diese Aktivitätssteigerung könnte die Folge der erhöhten Expression der *GSTP1* nach 24 h sein. Obwohl die fermentierten Probiotika allein (FÜ Blank +) eine signifikante aktivitätssteigernde Wirkung (2-fach) besaßen, waren die Probiotika nicht in der Lage, den Effekt des fermentierten Aleurons zu steigern. Dies deutet darauf hin, dass die annähernd gleichen Butyratkonzentrationen in den 10 % FÜ (FÜ Aleuron –: 2,4 mM, FÜ Aleuron +: 3,0 mM) die Ursache für dieses Ergebnis sind. Es war nachweisbar, dass die Aktivitätssteigerung anteilig auf Butyrat zurückzuführen ist. In einer früheren Arbeit von Glei *et al.* zeigte sich eine Induktion der Gesamtenzymaktivität der GST in HT29-Zellen nach der Inkubation mit einem komplexen FÜ der Arabinoxylane (160). Diese Aktivitätszunahme wurde hauptsächlich dem enthaltenen Butyrat zugeschrieben.

In den Untersuchungen mit gesunden humanen Kolonozyten spiegelte sich eine erhöhte Expression der *GSTP1* durch die Testsubstanzen nicht in einer erhöhten Aktivität der GST wider (**Publikation III**). Gründe dafür wurden bereits im Kapitel 5.2.2 diskutiert.

Die Inkubation der HT29-Zellen mit dem fermentierten Aleuron allein (FÜ Aleuron –) sowie mit den Probiotika (FÜ Aleuron +) äußerte sich in einer zunehmenden Katalaseakti-

vität (**Publikation III**). Jedoch unterschieden sich beide FÜ nicht in ihrer Wirkung voneinander, so dass die Zugabe der Probiotika hinsichtlich der vom Aleuron ausgehenden Wirkung keinen Zusatznutzen erbrachte. Die Aktivitätserhöhung ist vermutlich die Konsequenz der signifikant induzierten Genexpression der Katalase. Eine erhöhte enzymatische Aktivität der Katalase könnte in eine Reduktion von oxidativem Stress involviert sein, was im Rahmen der Chemoprävention des Kolonkrebses von Bedeutung wäre.

Analog zur Genexpression der Katalase in den Primärzellen, war keine Modulation ihrer enzymatischen Aktivität durch die FÜ nachzuweisen (**Publikation III**), was im Widerspruch zu früheren Arbeiten von Sauer *et al.* (226) steht. Allerdings wurde hier mit 10 mM Butyrat gearbeitet und die Aktivitätserhöhung bereits nach 2 h beobachtet. Interessanterweise nahm diese Aktivitätssteigerung nach Inkubation der Primärzellen mit Butyrat über den Zeitraum von 4 bis 8 h wieder ab. Sie zeigten, dass nach 4 h 85 % das zugegebene Butyrat im Zellkulturmedium vorliegen, wobei nach 12 h eine Zunahme auf 95 % Butyrat im Medium messbar war. Nach Fitch und Fleming wird im Dickdarm absorbiertes Butyrat teilweise aus den Zellen sekretiert, wodurch es in den Blutstrom gelangt (234). Basierend auf diesem Mechanismus erklärt sich möglicherweise die Zunahme des Gehaltes an Butyrat im Medium nach 12 h im Vergleich zum Zeitpunkt nach 4 h. Infolgedessen könnte angenommen werden, dass in den vorliegenden Untersuchungen nach 10 h das aufgenommene Butyrat größtenteils in das Zellkulturmedium abgegeben wurde. Der geringe Butyratgehalt in den Primärzellen ist vermutlich nicht ausreichend, die Katalaseaktivität nach 10 h Inkubation mit den FÜ zu beeinflussen. Insgesamt waren starke interindividuelle Variationen in der Sensitivität der Spendergewebe gegenüber der Inkubation mit den FÜ zu erkennen, was für die unterschiedlichen Effekte verantwortlich sein kann.

### 5.3.3 Schutz gegenüber oxidativem Stress – antigenotoxische Eigenschaften in humanen Kolonozyten

Inwieweit die positive Modulation der Genexpression und Enzymaktivität mit einem Schutz gegenüber oxidativem Stress assoziiert ist, zeigten die Untersuchungen zur Erfassung des antigenotoxischen Potentials von fermentiertem Aleuron ohne und mit Zugabe der Probiotika LGG<sup>®</sup>/Bb12. Eine Induktion des oxidativen Stresses in HT29-Zellen wurde durch die Inkubation mit der Modellsubstanz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erzielt, was sich in der Zunahme der mittels Comet-Assay detektierten DNA-Schäden äußerte (**Publikation III**). Die mit dem fermentierten Aleuron (FÜ Aleuron –) präinkubierten HT29-Zellen zeigten eine Reduktion

der DNA-Schäden nach 48 h (**Publikation III**). Interessanterweise erbrachte die Zugabe der Probiotika LGG<sup>®</sup>/Bb12 (FÜ Aleuron +) einen zusätzlichen Nutzen, wodurch eine weitere signifikante Verminderung der induzierten DNA-Schäden nachweisbar war. In einer *in vivo* Rattenstudie wurden Fäzeswässer nach vorhergehender Intervention mit Prä- und Synbiotika gewonnen (235). Diese Fäzeswässer besaßen in humanen Zelllinien antigenotoxische Effekte. Eine von Rowland *et al.* durchgeführte Rattenstudie zeigte, dass eine kombinierte Gabe aus präbiotischen Inulin und dem Probiotikum *Bifidobacterium longum* hemmend auf die Bildung AOM-induzierter ACF wirkte (114). Die von dem Synbiotikum ausgehende Wirkung war stärker als die der jeweiligen Einzelsubstanzen. Humane Interventionsstudien verwiesen zugleich auf ein antigenotoxisches Potential eines Synbiotika (Oligofruktose-angereichertem Inulin und LGG<sup>®</sup>/Bb12) (136). Nach der Intervention war eine signifikante Abnahme der DNA-Schäden in den Adenomen der Patienten zu beobachten.

Das vorliegende antigenotoxische Potential der Testsubstanzen war eventuell mit den erhöhten Enzymaktivitäten der GST und Katalase (**Publikation III**) assoziiert, welche in den Zellschutz gegenüber oxidativem Stress involviert sind (68, 236). Außerdem ist davon auszugehen, dass direkte antioxidative Wirkungen und/oder der Einfluss auf DNA-Reparaturmechanismen zu den protektiven Effekten beigetragen haben (94, 98). Insbesondere für Butyrat wurde beschrieben, dass es die Zugänglichkeit von DNA-Reparaturenzymen zum Chromatin in HT29-Zellen erhöht und so die Höhe von induzierten DNA-Schäden reduziert (94). Der aufgezeigte Zusatznutzen durch die Probiotika könnte zum Beispiel im Abfangen von Kanzerogenen begründet sein, bevor diese die DNA erreichen (121, 237). Diese Annahme wurde bereits nach Untersuchungen mit Starterkulturen für die Joghurtherstellung nach Reduktion von DMH- und MNNG- (N-Methyl-N'-Nitroso-N-Nitroguanidin)-induzierten DNA Schäden diskutiert (237). Des Weiteren könnte der zusätzliche Nutzen, der von den Probiotika ausgeht, aus der Freisetzung der Ferulasäure aus den Arabinoxylanen des Aleurons resultieren. Diese besitzt antioxidative Eigenschaften und schützt daher die Zellen vor oxidativem Stress (140, 238, 239).



#### 5.4 Einfluss der Fermentation von Aleuron mit/ohne Zugabe der Probiotika LGG®/Bb12 auf die Bakterienzusammensetzung im Fermentationspellet

Die Darmflora leistet einen bedeutenden Beitrag zur Gesundheit des Menschen. Sie fungiert als erste Barriere gegen die Ansiedlung pathogener Keime und ist ein wichtiger Bestandteil der humanen Abwehr, indem sie die Entwicklung und Aktivität des Darm-assoziierten Immunsystems beeinflusst (4). Darüber hinaus leistet sie einen besonderen Beitrag zum intraluminalen Stoffwechsel im Dickdarm, indem sie beispielsweise komplexe Nahrungsbestandteile, wie den Ballaststoffen, metabolisiert und Vitamine produziert (240). Aber auch ein pathogenes Potential wird beschrieben, indem einige Bakterienarten in der Lage sind, toxische, mutagene und kanzerogene Verbindungen zu bilden (13), welche wiederum Risikofaktoren für die Initiation und/oder Progression der Kolonkarzinogenese darstellen.

Unverdauliche Kohlenhydrate haben einen bedeutenden Einfluss auf die Zusammensetzung und den Metabolismus der Mikrobiota im Darm und können so die Darmgesundheit beeinflussen (241). Es werden verschiedene Mechanismen, über welche die Ballaststoffe positiv auf die Darmgesundheit wirken, postuliert. Durch die bakterielle Fermentation der Ballaststoffe werden den Epithelzellen des Darms SCFA geliefert, der mikrobielle Proteinmetabolismus und die Bildung sekundärer Gallensäuren und anderer Toxine unterdrückt (242, 243).

##### 5.4.1 Fermentation I

Grundsätzlich deuteten die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen auf eine Zunahme der Gesamtbakterien-Zellzahl durch die Fermentation des Aleurons (EU: 5-fach; US: 6,8-fach) im Vergleich zur Fäzeskontrolle (Tab. 5). Zudem war eine prozentuale Verschiebung der Bakterienzusammensetzung zugunsten der gesundheitsfördernden *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* nach Fermentation des Aleurons (EU und US) im Vergleich zur Fäzeskontrolle (FÜ Blank) nachzuweisen. Dies spiegelte sich wiederum in der Zunahme der Zellzahl der *Lactobacilli* (EU Aleuron: 2,8-fach; US Aleuron: 5,5-fach) und der *Bifidobacteria* (EU Aleuron: 2,2-fach; US Aleuron: 1,7) im Vergleich zur Fäzeskontrolle wider. Dabei wurde bereits in der Fäzeskontrolle ein hoher Anteil der gesundheitsfördernden *Bifidobacteria* beobachtet, was möglicherweise auf ein positives Bakterienprofil der Fäzes-Spender verweist. Die Zunahme der aufgeführten Bakteriengruppen war vermutlich die Konsequenz des bakteriellen Abbaus der Ballaststoffe des Aleurons, was durch Crittenden *et al.* für

verschiedene Stämme der *Bifidobacteria* und *Lactobacilli* unter Verwendung unterschiedlicher Ballaststoffe (u.a. Xylo-Oligosaccharide und Arabinoxylane) nachgewiesen werden konnte (242). Die Modulation des Bakterienprofils zugunsten dieser positiv-wirkender Bakterien, lässt auf ein präbiotisches Potential von Aleuron schließen. Auch der Anstieg der gesundheitsfördernden SCFA durch die Fermentation des Aleurons (103) im Vergleich zur Fäzeskontrolle (siehe Kapitel 5.1.2) unterstützt die Annahme des Verdaus der Arabinoxylane. *Bifidobacteria* und *Lactobacilli* produzieren vornehmlich Azetat und Laktat aus der Verstoffwechselung von unverdaulichen Ballaststoffen (106), was in dieser Arbeit für Azetat (siehe Kapitel 5.1.3) bestätigt werden konnte. Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien verweisen auf die zusätzliche Bildung von Butyrat durch die bakterielle Fermentation unverdaulicher Ballaststoffe (z. B. Fruktane des Inulin-Typs oder Oligofruktose) (106, 206), was häufig als so genannter „butyrogener Effekt“ bezeichnet wird (15). In der vorliegenden Studie war die Zunahme des prozentualen Anteils der *Bifidobacteria* und *Lactobacilli* neben der Zunahme von Azetat auch mit einem Anstieg an Butyrat verbunden. Für Butyrat sind bereits krebspräventive Eigenschaften beschrieben worden (95, 96), so dass die verstärkte Bildung dieser SCFA als positiv zu bewerten ist. In Untersuchungen von Belenguer *et al.* wurde nachgewiesen, dass *Bifidobacterium sp* in Gegenwart von Oligofruktose Laktat produzierten, welches wiederum in Gegenwart von *Eubacterium hallii* zu Butyrat metabolisiert werden kann (244). Die vermutlich bedeutendsten Butyratbildner sind Stämme der Spezies *Roseburia* und *Faecalibacteria* (245). So zeigten Walker *et al.*, dass einige Stämme dieser Spezies befähigt sind, Azetat in Butyrat umzuwandeln (245). Die mit der Bildung von Azetat einhergehende pH-Wert-Erniedrigung stimulierte *Roseburia* und *Faecalibacteria* und damit die Bildung von Butyrat (245).

Die mit der Zunahme der *Bifidobacteria* und *Lactobacilli* einhergehende SCFA-Bildung äußerte sich in einer pH-Wert-Senkung. Da eine Erniedrigung des pH-Wertes zu einer Aktivitätsminderung bakterieller Enzyme (z. B. 7 $\alpha$ -Dehydroxylase) und einer geringeren Löslichkeit der Gallensäuren führt (102, 103), könnte die positive Änderung der Bakterienzusammensetzung maßgeblich zur Reduktion der Konzentration der schädlichen DCA im FÜ Aleuron (EU und US) (103) beigetragen haben.

Der Anteil der als potentiell pathogen beschriebenen *Enterokokken*, insbesondere *E. faecalis* und *E. faecium* (246), nahm während der Fermentation des Aleurons im Vergleich zur Fäzeskontrolle ab. Vor allem *E. faecalis* ist bekannt für die Bildung von ROS (15, 247), wodurch eine Abnahme dieser in Verbindung mit der Zunahme der *Bifidobacteria* und/oder *Lactobacilli* als krebspräventiv interpretiert werden kann.

#### 5.4.2 Fermentation II

Einige Stämme der *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* werden aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Eigenschaften in Lebensmitteln als Probiotika eingesetzt (248). Deren Adhärenz am intestinalen Epithelium und Mukus ist assoziiert mit der Stimulation des Immunsystems und einer dauerhaften Kolonisation, wodurch sie das Gleichgewicht der Darmflora aufrechterhalten und somit auch die Ansiedlung pathogener Keime behindern (249).

Die Fermentation mit den Probiotika allein führte zur deutlichen Erhöhung der Bakterien-Gesamtzellzahl (3,8-fach) im Vergleich zur Fäzeskontrolle ( $79,9 \times 10^8/\text{ml}$ ). Damit war der Anstieg der *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* verbunden. Zum einen spiegelte dies die Zugabe der Probiotika LGG<sup>®</sup>/Bb12 (je  $3 \times 10^9$  KBE) wider. Zum anderen war durch den enormen Bakterienzuwachs zu vermuten, dass eine Verstoffwechselung von Fäzesinhaltsstoffen (u.a. Ballaststoffe) zu einer Stimulation des Bakterienwachstums stattgefunden hat. Der Bakterienzuwachs (5,2-fach) durch die alleinige Fermentation des Aleurons deutet ebenfalls auf einen erhöhten bakteriellen Abbau der Ballaststoffe des Aleurons, insbesondere den Arabinoxylanen, was sich auch im Anstieg der SCFA widerspiegelte (203). Dabei war ebenfalls zu beobachten, dass die Steigerung der Gesamtzellzahl mit der Verschiebung des prozentualen Verhältnisses der untersuchten Bakterien zugunsten der *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* im Vergleich zur Fäzeskontrolle assoziiert war. Hughes *et al.* beschrieben eine Induktion der Proliferation der *Bifidobacteria* und *Lactobacilli* nach der *in vitro* Fermentation von Arabinoxylanen unterschiedlicher Molekülmasse (162). In diesem Zusammenhang und im Vergleich zu bereits gut etablierten Präbiotika (Fruktane des Inulin-Typen) (162, 204) könnte daher auf ein präbiotisches Potential des Aleurons geschlossen werden. Des Weiteren wurde in einer kürzlich durchgeführten Humanstudie von Cloetens *et al.* eine Stimulation des *Bifidobacteria*-Wachstums nach Intervention mit Arabinoxylanen gezeigt (250). Die Fermentation von Aleuron und LGG<sup>®</sup>/Bb12 führte zu einer Steigerung der Gesamtzellzahl der Bakterien im Fermentationspellet (Blank –:  $79,9 \times 10^8/\text{ml}$ ; Aleuron +:  $630,6 \times 10^8/\text{ml}$ ), welche die der alleinigen Fermentation des Aleurons ( $415 \times 10^8/\text{ml}$ ) übertraf. Zudem war dieser Effekt ebenfalls mit einer Verschiebung des Verhältnisses der untersuchten Bakterien zugunsten der *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* gegenüber der Fäzeskontrolle verbunden. Diese Beobachtungen verweisen sowohl auf die Zugabe der Probiotika als auch wiederholt auf den bakteriellen Abbau der Ballaststoffe im Aleuron. Eine Erhöhung des Gehaltes der *Lactobacilli* (16 %) und *Bifidobacteria* (18 %)

zeigte sich auch in einer humanen Interventionsstudie durch den kombinierten Verzehr eines Synbiotikum (Synergy1 und LGG und Bb12) (136). Dieser Effekt war mit einer Reduktion von DNA-Schäden in den Kolonozyten von Patienten mit Adenomen assoziiert.

Des Weiteren spiegelte sich der Anstieg der gesundheitsfördernden *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* durch die Fermentation des Aleurons sowohl ohne als auch mit den Probiotika in der Zunahme der SCFA, insbesondere des Butyrates, in den FÜ (203) wider. Für *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* stellen Laktat und Azetat Produkte ihres Stoffwechsels dar. Walker *et al.* zeigten, dass einige der bedeutendsten Butyrat-bildende Stämme von *Roseburia* und *Faecalibacteria* nur Azetat zu Butyrat umwandeln (245). So konnten sie nachweisen, dass die mit der Bildung von Azetat einhergehende pH-Wert-Erniedrigung *Roseburia* und *Faecalibacteria* stimuliert und damit die Bildung von Butyrat vorantreibt (245). Da Laktat nur in geringen Konzentrationen im Dickdarm gesunder Menschen vorkommt, ist anzunehmen, dass andere Bakterien Laktat zu weiteren Metaboliten verstoffwechseln (206). So konnten Duncan *et al.* und Belenguer *et al.* in Gegenwart von Polysacchariden ein zunehmendes Wachstum von *Eubacterium hallii* und damit verbunden einen erhöhten Verbrauch von Laktat durch dieses Bakterium beobachten (206, 251, 252). In diesen Studien wurde diskutiert, dass die Bildung von Butyrat auf den Metabolismus dieses Bakteriums zurückzuführen war. Der durch die Zugabe der Probiotika begünstigte „butyrogene Effekt“ des Aleurons könnte über die beiden vorgestellten Mechanismen durch das Vorkommen von *E. hallii* und Stämmen von *Roseburia* und *Faecalibacteria* im Fäzes-Inokulum vermittelt worden sein. Die bereits zu Beginn dieses Kapitels beschriebene Bildung von Butyrat durch die alleinige Fermentation der Probiotika weist neben dem Vorhandensein von Ballaststoffen, bedingt durch die Ernährung der Fäzesspender, auf das Vorkommen zuletzt genannter Bakterien im Fäzes-Inokulum hin.

Des Weiteren war die Verschiebung des Bakterienprofils zugunsten der *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* mit der Abnahme des pH-Wertes durch die Fermentation des Aleurons mit/ohne LGG<sup>®</sup>/Bb12 (siehe Kapitel 5.1.3) assoziiert. Eine Verminderung des pH-Wertes hat die Reduktion der Aktivität bakterieller Enzyme wie der 7 $\alpha$ -Dehydroxylase und der Löslichkeit der Gallensäuren zur Folge (102, 103). Somit könnte der infolge der Änderung des Bakterienprofils stärker abnehmende pH-Wert (Blank +: 5,88; Aleuron -: 5,70; Aleuron +: 5,45) im Vergleich zur Fäzeskontrolle (6,38) für die stetige Abnahme der DCA-Konzentration (**Publikation III**) verantwortlich sein. DCA zeigt tumorpromovierende Eigenschaften (104, 105), so dass durch eine Reduktion dieser Gallensäure der Prozess der Krebsinitiation gehemmt werden könnte. Die Hemmung weiterer bakterieller Enzymaktivi-

täten (z. B.  $\beta$ -Glukuronidase und/oder Nitroreduktase) als Konsequenz des veränderten Bakterienprofils, könnte eine verminderte Bildung weiterer kanzerogener Substanzen zur Folge haben und damit der Karzinogenese entgegenwirken (102, 253). In einer Humanstudie resultierte die Intervention mit *Bifidobacterium longum* und *Lactobacillus acidophilus* in einer Erniedrigung der enzymatischen Aktivität der Nitroreduktase, was mit einer geringen Bildung der mutagenen Nitrosamine einherging (254). In einem Übersichtsartikel von Burns und Rowland werden verschiedene *in vivo* Untersuchungen aufgeführt, in denen eine Verminderung bakterieller Enzymaktivitäten wie der  $\beta$ -Glukuronidase, Nitroreduktase und  $\beta$ -Dehydroxylase durch die Gabe von Prä-, Pro- oder Synbiotika erreicht wurde (255). Eine Erniedrigung toxischer Stickstoffverbindungen (z. B. *N*-Nitroso-Verbindungen, Indole und Ammoniak (11)) ergibt sich durch einen erhöhten Metabolismus von Bakterien, welche unverdautes Protein und dessen Metabolite, vor allem Ammoniak, für den eigenen Stoffwechsel und eigenes Wachstum/Vermehrung verwenden können (197). So war in der dargestellten Arbeit die Zunahme der Gesamtzellzahl der Bakterien im Pellet des Blank + und Aleuron + mit der Abnahme des toxischen Ammoniaks im jeweiligen FÜ assoziiert (**Publication III**). Die Ballaststoffe des Aleuron und des Fäzes-Inokulum dienen sowohl den Bakterien im Fäzes-Inokulum als auch der Probiotika als Substrat für ihren Metabolismus, wodurch das Bakterienwachstum deutlich gefördert werden konnte. Dabei wurde vermutlich das in der Fäzeskontrolle und im Aleuron enthaltene Protein als Gerüstsubstanz für die nachkommenden Bakterien verwendet, was mit der reduzierten Bildung des Ammoniaks assoziiert war.

Zusätzlich könnte infolge des veränderten Bakterienprofils durch fermentiertes Aleuron mit/ohne LGG<sup>®</sup>/Bb12 eine Induktion der enzymatischen Aktivität mikrobieller Esterasen stattgefunden haben. Damit würde eine verstärkte Freisetzung der an den Arabinoxylanen gebundenen Ferulasäure erreicht werden (256, 257), was sich anschließend in antioxidativen Effekten äußern könnte.

Insgesamt kann gesagt werden, dass die Aufrechterhaltung einer gesunden Mikrobiota essentiell ist, da eine Verschiebung der Zusammensetzung hin zu „negativen“ Bakteriengruppen (z. B. *Streptococcus bovis*, *Bacteroides*, *Clostridien* und *Helicobacter pylori*) die Bildung von Kanzerogenen fördert und somit das Krebsrisiko erhöht (10).

## 5.5 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Dickdarmkrebs ist die zweithäufigsten Krebserkrankung und Krebstodesursache in Deutschland, wobei diese Form der Krebserkrankung zu ca. 70 % maßgeblich durch die Ernährung beeinflussbar ist. Eine gesunde Ernährungsweise mit einem hohen Anteil an Ballaststoffen sowie sekundären Pflanzenstoffen bietet einen guten Ansatz zur Prävention von Darmkrebs. Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war, Informationen über den Einfluss des Weizenaleurons auf die primäre Chemoprävention zu erlangen.

Aus den vorliegenden Untersuchungen und deren Ergebnisse lassen sich nun folgende Schlussfolgerungen ableiten:

- Das etablierte *in vitro* Modell ist für die Simulation von Verdauung und Fermentation komplexer, ballaststoffreicher Proben geeignet.
- Durch den integrierten Dialysevorgang und den Einsatz von an physiologischen Bedingungen orientierten Gallensäurekonzentrationen während der Dünndarmsimulation können FÜ generiert werden, welche in Zellkulturexperimenten ohne zytotoxische Nebenwirkungen einsetzbar sind.
- Die Fermentation des Aleurons resultiert in einer erhöhten Bildung von gesundheitsfördernden SCFA und einer Reduktion der tumorpromovierenden sekundären Gallensäure DCA.
- Eine kombinierte Fermentation von Aleuron und den Probiotika LGG<sup>®</sup>/Bb12 verstärkt die Bildung der SCFA, insbesondere Butyrat, und die Reduktion der DCA.
- Das im FÜ Aleuron enthaltene Ammoniak ist mit dem Proteingehalt des Aleurons assoziiert. Die Probiotika sind in der Lage, den Gehalt an Ammoniak zu reduzieren.
- Die Probiotika LGG<sup>®</sup>/Bb12 bilden Azetat, welches durch die Bakterien der Fäzesmatrix aber auch durch *Clostridium butyricum* zu Butyrat verstoffwechselt werden kann.
- Das fermentierte Aleuron ist in der Lage, die Genexpression von Enzymen des Entgiftungssystems (*GSTP1*, *Katalase*, *SULT2B1*) in HT29-Zellen zu induzieren.
- Die Erhöhung der Genexpression der *SULT2B1* durch die Fäzeskontrolle in HT29-Zellen deutet auf den Einfluss der hohen DCA-Konzentration im FÜ hin.

- Fermentiertes Aleuron erhöht die Genexpression der *GSTP1* in humanen Primärzellen. Dies kann zu einer verstärkten zellulären Abwehr gegenüber toxischen und kanzerogenen Stoffen beitragen und damit dem Initiationsprozess entgegenwirken.
- Es ist wahrscheinlich, dass die Induktion des Transkriptionsfaktors *MAF2* eine Rolle bei der Aktivierung der Genexpression von *GSTP1*, *Katalase* und *SULT2B1* spielt.
- Der Anstieg der Genexpression der *GSTP1* (Primär- und HT29-Zellen) und *Katalase* (HT29-Zellen) geht mit einer zunehmenden enzymatischen Gesamtaktivität der GST und/oder Katalase in den Primär- und HT29-Zellen einher. Eine damit verbundene erhöhte Entgiftung toxischer und kanzerogener Stoffe ist als ein wichtiger primärpräventiver Effekt anzusehen.
- Die Induktion der Enzymaktivitäten von GST und Katalase in HT29-Zellen ist nur partiell auf Butyrat zurückzuführen. Synergistische Effekte mit bisher nicht identifizierten Fermentationsmetaboliten tragen zu dieser Induktion bei.
- Eine Steigerung der enzymatischen Aktivität der GST und Katalase in den Primärzellen durch die Fäzeskontrolle weist auf den Einfluss bisher unbekannter bioaktiver Substanzen innerhalb der Fäzesmatrix hin.
- Fermentiertes Aleuron bewirkt eine deutliche Reduktion H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter DNA-Schäden in HT29-Zellen, was auf das veränderte Metabolitenspektrum im FÜ zurückgeführt werden kann, wozu auch die Fäzesmatrix beiträgt.
- LGG®/Bb12 verstärken das chemopräventive Potential des Aleurons, wodurch sie den Schutz gegenüber oxidativem Stress fördern.
- Weizenaleuron besitzt präbiotisches Potential, indem es das Wachstum der gesundheitsfördernden Bakterien *Bifidobacteria* und *Lactobacilli* stimuliert.
- Das Bakterienprofil wird durch Weizenaleuron und die Zugabe von Probiotika günstig beeinflusst. Das kann zur Aufrechterhaltung der Darmgesundheit beitragen, indem zum einen das Wachstum pathogener Keime gehemmt und zum anderen die Produktion der SCFA weiter verstärkt und die der DCA sowie des Ammoniaks vermindert wird.
- Bezogen auf die *in vivo* Situation lässt sich vermuten, dass der Verzehr von Aleuron-angereicherten Lebensmitteln und Probiotika einen wesentlich Beitrag zur Darmgesundheit des Menschen, insbesondere zur Krebsprävention, leisten kann.



## 5.6 Ausblick

In dieser Arbeit galt es ein für nachfolgende *in vitro* Untersuchungen geeignetes Verdauungs- und Fermentationsmodell zu entwickeln, um anschließend die chemopräventiven Eigenschaften von Weizenaleuron im Hinblick auf die Primärprävention untersuchen zu können. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob durch eine Kofermentation von Aleuron und Probiotika LGG®/Bb12 das primärpräventive Potential von fermentiertem Aleuron begünstigt wird.

Da die Primärprävention am Initiations- und Promotionsprozess der Karzinogenese ansetzt, sollten weitere Untersuchungen zur Bestimmung des chemopräventiven Potentials von Aleuron in gesundem Kolongewebe durchgeführt werden. Hierzu ist es notwendig, die Bedingungen für die Kultivierung der isolierten Primärzellen zu optimieren, um längerfristig Inkubationen mit unterschiedlichen Substanzen zu ermöglichen. Nur so besteht die Möglichkeit, Auswirkungen einer modulierten Genexpression von Enzymen auf die Proteinexpression und mögliche funktionellen Konsequenzen, wie Enzymaktivitäten, Reduktion induzierter DNA-Schäden, näher zu beleuchten.

Darüber hinaus sollte die Anzahl der Spender erhöht werden, um interindividuelle Variationen besser zu berücksichtigen und Effekte des Aleurons im gesunden Kolongewebe deutlicher herauszuarbeiten. Ebenso wäre eine Bestimmung des genetischen Profils der Spender denkbar, da Polymorphismen, häufig mit einer veränderten Reaktion gegenüber verschiedener Testsubstanzen einhergehen.

Des Weiteren ist abzuklären, über welche Signaltransduktionswege die Modulation des Entgiftungssystems und der Enzyme der oxidativen Abwehr durch fermentiertes Aleuron stattfindet.

Zur Abschätzung, inwieweit Aleuron allein sowie in Kombination mit Probiotika die Darmgesundheit im Rahmen der Chemoprävention von Dickdarmkrebs *in vivo* beeinflusst, wäre die Durchführung einer Interventionsstudie nützlich. Jedoch ist die Entnahme von Biopsieproben nur begrenzt möglich ist. Als potentielle Biomarker würden daher die Bestimmung der Fermentationsmetabolite (SCFA, DCA und Ammoniak), des Gesamtphenol-/Ferulasäuregehaltes und die bakterielle Zusammensetzung des Fäzes verbunden mit Untersuchungen zum toxischen Potential des Fäzeswassers erste Hinweise auf krebspräventive Effekte des Aleuron mit/ohne Aufnahme von Probiotika *in vivo* liefern.

## 6 Zusammenfassung

**Einleitung:** Der Dickdarmkrebs ist weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung und eine der häufigsten krebsbedingten Todesursachen. Schätzungen zufolge können durch eine ausgewogene Ernährungsweise bis zu 70 % aller sporadisch auftretenden Kolonkarzinome vermieden werden. Im Fokus epidemiologischer Studien stehen die Ballaststoffe, deren Verzehr als positiv hinsichtlich der Chemoprävention von Dickdarmkrebs diskutiert wird. Ballaststoffe unterliegen im Dickdarm einem bakteriellen Abbau, wodurch u. a. eine erhöhte Bildung der gesundheitsfördernden SCFA stattfindet. Weizenaleuron ist reich an Ballaststoffen sowie sekundären Pflanzenstoffen und kann möglicherweise im Rahmen der Primärprävention dem Initiations-/Promotionsprozess der Karzinogenese entgegenwirken.

**Ziel:** Ziel dieser Arbeit war zunächst ein *in vitro* Fermentationssystem zu etablieren, welches den vollständigen Verdauungsprozess simuliert und den Einsatz der resultierenden Fermentationsüberstände (FÜ) in Zellkulturuntersuchungen ermöglicht. Anschließend sollte untersucht werden, ob fermentiertes Weizenaleuron mit/ohne Zugabe der Probiotika LGG<sup>®</sup>/Bb12 Enzyme des zellulären fremdstoffmetabolisierenden und antioxidativen Schutzsystems in humanen Kolonozyten und die Bakterienzusammensetzung beeinflusst.

**Methoden:** Zur Etablierung des Fermentationssystems unter Einschluss einer Dialyse während der Dünndarmsimulation wurde Weizenvollkornmehl mit verschiedenen Gallensäurekonzentrationen verdaut und fermentiert und die gewonnenen FÜ hinsichtlich ihrer Zytotoxizität untersucht. Anschließend wurde mit dem entwickelten Fermentationsmodell Weizenaleuron  $\pm$  LGG<sup>®</sup>/Bb12 verdaut und fermentiert. Die generierten FÜ wurden hinsichtlich verschiedener Fermentationsmetabolite (SCFA, Ammoniak, Cholsäure (CA), Deoxycholsäure (DCA)) chemisch (GC-MS, Berthelot-Reaktion, HPLC-MS/MS) analysiert. Die bakterielle Zusammensetzung wurde im Zellpellet mittels *real-time* qPCR erfasst. Die Kolonozyten – humane Primärzellen und HT29-Zellen – wurden mit den FÜ und synthetischen Gemischen der SCFA und Butyrat, welche im Gehalt dem komplexen FÜ entsprachen, inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung der mRNA-Expression von *GSTP1*, *Katalase* und *SULT2B1* (*real-time* qPCR) sowie der Enzymaktivität der Gesamt-GST und Katalase (spektrophotometrische Messungen). Als funktionelle Konsequenz wurde das antigenotoxische Potential gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Schäden mittels Comet Assay gemessen.

**Ergebnisse:** Durch die Zugabe einer physiologischen Gallensäurekonzentration zur Dünndarmsimulation konnten FÜ gewonnen werden, die keine zytotoxischen Effekte aufwiesen

und daher erfolgreich in Zellkulturexperimente eingesetzt werden konnten. Die Integration einer Dialyse optimierte die Dünndarmsimulation, indem Spaltprodukte der Stärke (Glukose) und Gallensäuren effizient dialysiert wurden. Der bakterielle Abbau des Aleurons spiegelte sich in der erhöhten Bildung der SCFA und der Reduktion der DCA wider. Zudem zeigte sich die Zunahme der Gesamtbakterienzellzahl im Fermentationspellet, was mit einer Verschiebung des prozentualen Verhältnisses der Bakterien zugunsten der *Bifidobacteria* und *Lactobacilli* verbunden war. Diese Effekte konnten durch die Zugabe von LGG<sup>®</sup>/Bb12 verstärkt werden. Der Gehalt des Ammoniaks wurde durch die Fermentation des Aleurons gegenüber der Fäzeskontrolle gesteigert, was mit dem erhöhten Proteingehalt des Aleurons in Verbindung stand. Die kombinierte Fermentation von Aleuron und Probiotika bewirkte die Reduktion des Ammoniaks im FÜ. Fermentiertes Aleuron allein war in der Lage mRNA-Expression von *GSTP1* (Primärzellen und HT29-Zellen), *Katalase* (HT29-Zellen) und *SULT2B1* (HT29-Zellen) signifikant zu steigern, wobei auch die Fäzeskontrolle die Expression der *SULT2B1* erhöhte. Als mögliche Folge einer gesteigerten mRNA-Expression ließ sich eine signifikante Induktion der Enzymaktivitäten der Gesamt-GST und/oder Katalase in Primärzellen und HT29-Zellen nachweisen. Dabei konnte die Wirkung partiell auf Butyrat zurückgeführt werden. In HT29-Zellen induzierte DNA-Schäden nahmen durch Inkubation mit fermentiertem Aleuron ( $\pm$ LGG<sup>®</sup>/Bb12) signifikant ab, wobei die Probiotika einen Zusatznutzen erbrachten.

**Schlussfolgerung:** Mit Hilfe des etablierten Fermentationssystems können nicht-zytotoxische FÜ generiert werden, welche anschließend in Zellkulturexperimenten einsetzbar sind. Die Fermentation des Aleurons führt zur Bildung gesundheitsfördernder SCFA, Reduktion tumorpromovierender Metabolite (DCA, Ammoniak) und zur Zunahme der *Lactobacilli* und *Bifidobacteria*, was durch Probiotika noch begünstigt wird. Fermentiertes Aleuron besitzt primärpräventives Potential, indem es fremdstoffmetabolisierende (z. B. *GSTP1*, *SULT2B1*) und antioxidativ-wirkende Enzyme (z. B. Katalase) in Kolonozysten induziert und die Zellen vor oxidativem Stress schützt. Die Probiotika sind befähigt, den durch Aleuron-induzierten Schutz gegenüber oxidativen Stress zu verstärken. Nach den vorliegenden Befunden kann davon ausgegangen werden, dass ein Verzehr von Aleuron-angereicherten Lebensmitteln gemeinsam mit der Aufnahme von Probiotika eine Möglichkeit bietet, primärpräventiv in die Entstehung von Dickdarmkrebs einzugreifen.

## 7 Abstract

**Introduction:** Colorectal cancer is one of the most common causes of death from cancer worldwide. This cancer occurs at high incidence and is associated with diet and lifestyle factors. It is suggested that up to 70 % of sporadic cancer development can effectively prevented by a healthy diet including high amounts of dietary fiber. Dietary fiber is fermented by the human gut flora resulting mainly in the formation of SCFA, in particular butyrate. They could act on primary cancer prevention by activation of detoxifying and antioxidative enzymes. Wheat aleurone is rich in dietary fiber as well as secondary plant compounds and may act as chemopreventive agents in the early process of cancer development

**Aim:** First of all, the aim of this study was to establish a new *in vitro* model simulating the whole gastrointestinal tract considering physiological condition, suitable for subsequent cell culture experiments. Another aim was to examine whether enzymes involved in primary cancer prevention (stress response and xenobiotics metabolism) can be modulated by the resulting fermentation supernatants (fs) of wheat aleurone. Further, we investigated whether fs of the combined administration of aleurone and probiotics LGG<sup>®</sup>/Bb12 during fermentation would influence the chemopreventive effects of the fs aleurone.

**Methods:** Wholemeal wheat flour was digested and fermented *in vitro* with a fermentation model using different bile acid concentrations. In addition, a dialysis during duodenum simulation was included. Afterwards the cytotoxicity of the generated fs was measured. Subsequently, the established fermentation model was used to generate fs of wheat aleurone ( $\pm$ LGG<sup>®</sup>/Bb12). The resulting fs were characterised for the metabolites SCFA (GC-MS), deoxycholic acid (DCA) (HPLC-MS/MS) and ammonia (Berthelot reaction). The bacterial profile was determined in the fermentation pellets using *real-time* qPCR. Colonocytes were incubated with the fs and synthetic mixtures of SCFA and butyrate reflecting the concentration in the complex fs. Afterwards mRNA expression of *GSTP1*, *catalase*, and *SULT2B1* (*real-time* qPCR) as well as enzyme activity of total GST and catalase (spectrophotometrically measurements) were determined. At last, as a functional consequence the antigenotoxic potential against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage was examined in HT29 cells using the comet assay.

**Results:** The strong cytotoxic effect of the fs, which was partly due to cholic acid and DCA, were diminished by lowering the bile acid concentration to the more physiological amount (0.6 g/l) allowing the use of the fs in cell culture experiments. The integration of a dialysis step optimized the duodenum simulation by removing the cleavage product glu-

cose as well as a part the bile acids. The bacterial metabolism of aleurone was reflected by an increased SCFA production, reduced DCA concentration. In addition, the total bacterial cell number increased in the fermentation pellet. This was associated with a shift in the percentage ratio of the bacteria for the benefit of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli*. These effects were enforced by addition of the probiotics. Moreover, the amount of ammonia was increased which was linked with the protein content of aleurone. The addition of the probiotics could decrease this amount of ammonia. Fs aleurone was able to significantly induce mRNA expression of *GSTP1* (primary and HT29 cells), *catalase* (HT29 cells) and *SULT2B1* (HT29 cells), whereas also the faecal control induced *SULT2B1* mRNA expression. As a possible consequence of the modulated mRNA expression a significant induction of enzyme activity of total GST and/or catalase could be measured in HT29 cells. At this, butyrate was partially responsible for this effect. In HT29 cells the induced DNA damage was significantly decreased by fermented aleurone ( $\pm$ LGG<sup>®</sup>/Bb12), notably the probiotics provided an additional benefit.

**Conclusion:** The established *in vitro* model, using physiological bile acid concentrations, can be used to generate non-cytotoxic fs for cell culture experiments. Fermentation of aleurone results in the production of health-promoting SCFA, reduction of the amount of tumorpromoting metabolites (DCA, ammonia) and increases the growth of *lactobacilli* and *bifidobacteria*. These parameters are encouraged by the use the probiotics. Altogether, wheat aleurone is able to act on marker of primary chemoprevention by inducing mRNA expression and the activity of enzymes involved in detoxification of carcinogens and antioxidative defence. The probiotics are even able to promote protection against oxidative DNA damage by fermented aleurone. A consumption of aleurone enriched foodstuff in combination with LGG<sup>®</sup>/Bb12 may provide an opportunity to inhibit initiation/promotion of colon carcinogenesis.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Zoetendal, E. G.; Rajilic-Stojanovic, M.; de Vos, W. M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* **2008**, *57* (11), 1605-1615.
2. Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Wilson, I. D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (5), 431-438.
3. Sansonetti, P. J. To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question. *Mucosal. Immunol.* **2011**, *4* (1), 8-14.
4. O'Hara, A. M.; Shanahan, F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* **2006**, *7* (7), 688-693.
5. Holzapfel, W. H.; Haberer, P.; Snel, J.; Schillinger, U.; Huis, i., V Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol.* **1998**, *41* (2), 85-101.
6. Schulze, J.; Sonnenborn, U.; Ölschläger, T.; Kruis, W. *Probiotika*; Hippokrates Verlag: Stuttgart, 2008.
7. Kleessen, B.; Blaut, M. Modulation of gut mucosal biofilms. *Br. J Nutr.* **2005**, *93 Suppl 1*, S35-S40.
8. Manning, T. S.; Gibson, G. R. Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. *Best. Pract. Res Clin. Gastroenterol.* **2004**, *18* (2), 287-298.
9. Kolida, S.; Tuohy, K.; Gibson, G. R. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *Br. J Nutr.* **2002**, *87 Suppl 2*, S193-S197.
10. Davis, C. D.; Milner, J. A. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J Nutr. Biochem.* **2009**, *20* (10), 743-752.
11. Hughes, R.; Magee, E. A.; Bingham, S. Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2000**, *1* (2), 51-58.
12. Gibson, G. R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J. Nutr.* **1999**, *129* (7 Suppl), 1438S-1441S.
13. Wisker, E. Präbiotika: Überblick über die Ergebnisse von Studien am Menschen. *Ernährungsumschau* **2002**, *49* (12).
14. Terzic, J.; Grivennikov, S.; Karin, E.; Karin, M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* **2010**, *138* (6), 2101-2114.
15. Huycke, M. M.; Gaskins, H. R. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp. Biol. Med. (Maywood. )* **2004**, *229* (7), 586-597.
16. Statistisches Bundesamt Todesursachenstatistik Deutschland. *Wiesbaden* **2009**.
17. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.(GEKID) & Robert Koch Institut (RKI) Krebs in Deutschland 2005-2006. Häufigkeiten und Trends. *7. Auflage* **2010**.

18. Anand, P.; Kunnumakkara, A. B.; Sundaram, C.; Harikumar, K. B.; Tharakan, S. T.; Lai, O. S.; Sung, B.; Aggarwal, B. B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res* **2008**, *25* (9), 2097-2116.
19. Doll, R.; Peto, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl. Cancer Inst.* **1981**, *66* (6), 1191-1308.
20. Rieger, P. T. The biology of cancer genetics. *Semin. Oncol. Nurs.* **2004**, *20* (3), 145-154.
21. Grady, W. M.; Carethers, J. M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* **2008**, *135* (4), 1079-1099.
22. Dove-Edwin, I.; Thomas, H. J. Review article: the prevention of colorectal cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2001**, *15* (3), 323-336.
23. Calvert, P. M.; Frucht, H. The genetics of colorectal cancer. *Ann. Intern. Med.* **2002**, *137* (7), 603-612.
24. Fearon, E. R.; Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **1990**, *61* (5), 759-767.
25. Oliveira, P. A.; Colaco, A.; Chaves, R.; Guedes-Pinto, H.; De-La-Cruz, P. L.; Lopes, C. Chemical carcinogenesis. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2007**, *79* (4), 593-616.
26. Arends, J. W. Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol.* **2000**, *190* (4), 412-416.
27. Lipkin, M. Biomarkers of increased susceptibility to gastrointestinal cancer: new application to studies of cancer prevention in human subjects. *Cancer Res* **1988**, *48* (2), 235-245.
28. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100* (1), 57-70.
29. Fearon, E. R. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**, *768*, 101-110.
30. Ko, L. J.; Prives, C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* **1996**, *10* (9), 1054-1072.
31. Haffner, R.; Oren, M. Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1995**, *5* (1), 84-90.
32. Bonovas, S.; Tsantes, A.; Drosos, T.; Sitaras, N. M. Cancer chemoprevention: a summary of the current evidence. *Anticancer Res* **2008**, *28* (3B), 1857-1866.
33. Hawk, E. T.; Umar, A.; Viner, J. L. Colorectal cancer chemoprevention--an overview of the science. *Gastroenterology* **2004**, *126* (5), 1423-1447.
34. Lila, M. A. From beans to berries and beyond: teamwork between plant chemicals for protection of optimal human health. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1114*, 372-380.
35. Williams, M. T.; Hord, N. G. The role of dietary factors in cancer prevention: beyond fruits and vegetables. *Nutr. Clin. Pract.* **2005**, *20* (4), 451-459.
36. Riboli, E.; Norat, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am. J Clin. Nutr.* **2003**, *78* (3 Suppl), 559S-569S.

37. Giovannucci, E. Diet, body weight, and colorectal cancer: a summary of the epidemiologic evidence. *J Womens Health (Larchmt. )* **2003**, 12 (2), 173-182.
38. Wattenberg, L. W. Prevention--therapy--basic science and the resolution of the cancer problem. *Cancer Res* **1993**, 53 (24), 5890-5896.
39. De, F. S.; Izzotti, A.; D'Agostini, F.; Balansky, R. M.; Noonan, D.; Albini, A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mutat. Res* **2001**, 480-481, 9-22.
40. Johnson, I. T. Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, 40 (8), 1171-1178.
41. Surh, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3 (10), 768-780.
42. Tsao, A. S.; Kim, E. S.; Hong, W. K. Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J Clin.* **2004**, 54 (3), 150-180.
43. Xu, C.; Li, C. Y.; Kong, A. N. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res* **2005**, 28 (3), 249-268.
44. Liska, D. J. The detoxification enzyme systems. *Altern. Med. Rev.* **1998**, 3 (3), 187-198.
45. Virkel, G.; Carletti, M.; Cantiello, M.; Della, D. L.; Gardini, G.; Girolami, F.; Nebbia, C. Characterization of xenobiotic metabolizing enzymes in bovine small intestinal mucosa. *J Vet. Pharmacol. Ther.* **2010**, 33 (3), 295-303.
46. Liska, D.; Lyon, M.; Jones, D. S. Detoxification and biotransformational imbalances. *Explore. (NY)* **2006**, 2 (2), 122-140.
47. Wätjen, W.; Fritsche, E. Die Rolle des Fremdstoffmetabolismus in Pharmakologie und Toxikologie. Teil 2: Phase-II-Reaktionen. *Gebr. Störck GmbH & Co. Verlags-oHG* **2010**.
48. *Lehrbuch der Toxikologie*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 2003.
49. Hayes, J. D.; Flanagan, J. U.; Jowsey, I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, 45, 51-88.
50. Hayes, J. D.; Pulford, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 30 (6), 445-600.
51. Hoensch, H.; Peters, W. H.; Roelofs, H. M.; Kirch, W. Expression of the glutathione enzyme system of human colon mucosa by localisation, gender and age. *Curr. Med. Res Opin.* **2006**, 22 (6), 1075-1083.
52. Zhang, Y.; Gonzalez, V.; Xu, M. J. Expression and regulation of glutathione S-transferase P1-1 in cultured human epidermal cells. *J Dermatol. Sci.* **2002**, 30 (3), 205-214.
53. Grubben, M. J.; van den Braak, C. C.; Nagengast, F. M.; Peters, W. H. Low colonic glutathione detoxification capacity in patients at risk for colon cancer. *Eur. J Clin. Invest* **2006**, 36 (3), 188-192.



54. Eaton, D. L.; Bammler, T. K. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.* **1999**, *49* (2), 156-164.
55. Hoensch, H.; Morgenstern, I.; Petereit, G.; Siepmann, M.; Peters, W. H.; Roelofs, H. M.; Kirch, W. Influence of clinical factors, diet, and drugs on the human upper gastrointestinal glutathione system. *Gut* **2002**, *50* (2), 235-240.
56. Hayes, J. D.; Strange, R. C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* **2000**, *61* (3), 154-166.
57. Awasthi, Y. C.; Sharma, R.; Singhal, S. S. Human glutathione S-transferases. *Int. J. Biochem* **1994**, *26* (3), 295-308.
58. Scharmach, E.; Hessel, S.; Niemann, B.; Lampen, A. Glutathione S-transferase expression and isoenzyme composition during cell differentiation of Caco-2 cells. *Toxicology* **2009**, *265* (3), 122-126.
59. Ginsberg, G.; Smolenski, S.; Hattis, D.; Guyton, K. Z.; Johns, D. O.; Sonawane, B. Genetic Polymorphism in Glutathione Transferases (GST): Population distribution of GSTM1, T1, and P1 conjugating activity. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit Rev.* **2009**, *12* (5-6), 389-439.
60. Peters, W. H.; Kock, L.; Nagengast, F. M.; Kremers, P. G. Biotransformation enzymes in human intestine: critical low levels in the colon? *Gut* **1991**, *32* (4), 408-412.
61. Gamage, N.; Barnett, A.; Hempel, N.; Duggleby, R. G.; Windmill, K. F.; Martin, J. L.; McManus, M. E. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol. Sci.* **2006**, *90* (1), 5-22.
62. Runge-Morris, M.; Kocarek, T. A. Regulation of Sulfotransferase and UDP-Glucuronosyltransferase Gene Expression by the PPARs. *PPAR. Res* **2009**, *2009*, 728941.
63. Coughtrie, M. W.; Johnston, L. E. Interactions between dietary chemicals and human sulfotransferases-molecular mechanisms and clinical significance. *Drug Metab Dispos.* **2001**, *29* (4 Pt 2), 522-528.
64. Saini, S. P.; Sonoda, J.; Xu, L.; Toma, D.; Uppal, H.; Mu, Y.; Ren, S.; Moore, D. D.; Evans, R. M.; Xie, W. A novel constitutive androstane receptor-mediated and CYP3A-independent pathway of bile acid detoxification. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65* (2), 292-300.
65. Tamura, H. O.; Taniguchi, K.; Hayashi, E.; Hiyoshi, Y.; Nagai, F. Expression profiling of sulfotransferases in human cell lines derived from extra-hepatic tissues. *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24* (11), 1258-1262.
66. Epe, B. Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol. Chem.* **2002**, *383* (3-4), 467-475.
67. Feig, D. I.; Reid, T. M.; Loeb, L. A. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res* **1994**, *54* (7 Suppl), 1890s-1894s.
68. Klaunig, J. E.; Kamendulis, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *44*, 239-267.

69. Klaunig, J. E.; Kamendulis, L. M.; Hoocevar, B. A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* **2010**, *38* (1), 96-109.
70. Marnett, L. J.; Riggins, J. N.; West, J. D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin. Invest* **2003**, *111* (5), 583-593.
71. Toyokuni, S.; Okamoto, K.; Yodoi, J.; Hiai, H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* **1995**, *358* (1), 1-3.
72. Mates, J. M.; Perez-Gomez, C.; Nunez, d. C., I Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **1999**, *32* (8), 595-603.
73. Deshpande, S. S.; Irani, K. Oxidant signalling in carcinogenesis: a commentary. *Hum. Exp. Toxicol.* **2002**, *21* (2), 63-64.
74. Goyal, M. M.; Basak, A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell* **2010**, *1* (10), 888-897.
75. Kirkman, H. N.; Gaetani, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem. Sci.* **2007**, *32* (1), 44-50.
76. WCRF; AICR *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*; **2007**.
77. Young, G. P.; Hu, Y.; Le Leu, R. K.; Nyskohus, L. Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment--gene interactions. *Mol. Nutr. Food Res* **2005**, *49* (6), 571-584.
78. American Association of Cereal Chemists (AACC) *Cereal Foods World* **2001**, *46* (3), 112-126.
79. Gray, J. Dietary fibre - Definition, Analysis, Physiology & Health. Champ, M., Ed.; International Life Science Institute (ILSI) Europe: Belgium, 2006.
80. Burkitt, D. P. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* **1971**, *28* (1), 3-13.
81. Bingham, S.; Riboli, E. Diet and cancer--the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (3), 206-215.
82. Bingham, S. A.; Norat, T.; Moskal, A.; Ferrari, P.; Slimani, N.; Clavel-Chapelon, F.; Kesse, E.; Nieters, A.; Boeing, H.; Tjonneland, A.; Overvad, K.; Martinez, C.; Dorronsoro, M.; Gonzalez, C. A.; Ardanaz, E.; Navarro, C.; Quiros, J. R.; Key, T. J.; Day, N. E.; Trichopoulou, A.; Naska, A.; Krogh, V.; Tumino, R.; Palli, D.; Panico, S.; Vineis, P.; Bueno-De-Mesquita, H. B.; Ocke, M. C.; Peeters, P. H.; Berglund, G.; Hallmans, G.; Lund, E.; Skeie, G.; Kaaks, R.; Riboli, E. Is the association with fiber from foods in colorectal cancer confounded by folate intake? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2005**, *14* (6), 1552-1556.
83. Schatzkin, A.; Mouw, T.; Park, Y.; Subar, A. F.; Kipnis, V.; Hollenbeck, A.; Leitzmann, M. F.; Thompson, F. E. Dietary fiber and whole-grain consumption in relation to colorectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85* (5), 1353-1360.
84. Ferguson, L. R. Does a diet rich in dietary fibre really reduce the risk of colon cancer? *Dig. Liver Dis.* **2005**, *37* (3), 139-141.

85. Hung, H. C.; Joshipura, K. J.; Jiang, R.; Hu, F. B.; Hunter, D.; Smith-Warner, S. A.; Colditz, G. A.; Rosner, B.; Spiegelman, D.; Willett, W. C. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *JNCI Cancer Spectrum* **2004**, *96* (21), 1577-1584.
86. Pool-Zobel, B. L. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Br. J Nutr.* **2005**, *93 Suppl 1*, S73-S90.
87. Schatzkin, A.; Kipnis, V. Could exposure assessment problems give us wrong answers to nutrition and cancer questions? *J Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96* (21), 1564-1565.
88. Ferguson, L. R.; Harris, P. J. The dietary fibre debate: more food for thought. *Lancet* **2003**, *361* (9368), 1487-1488.
89. Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, N. a. t. P. o. C. D.; World Health Organization. Dept. of Nutrition for Health and Development *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic diseases*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, **2003**.
90. Lipkin, M.; Reddy, B.; Newmark, H.; Lamprecht, S. A. Dietary factors in human colorectal cancer. *Annu. Rev. Nutr.* **1999**, *19*, 545-586.
91. Wong, J. M.; de, S. R.; Kendall, C. W.; Emam, A.; Jenkins, D. J. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* **2006**, *40* (3), 235-243.
92. Cummings, J. H. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* **1981**, *22* (9), 763-779.
93. Scheppach, W.; Bartram, P.; Richter, A.; Richter, F.; Liepold, H.; Dusel, G.; Hofstetter, G.; Ruthlein, J.; Kasper, H. Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. *JPEN J Parenter. Enteral Nutr.* **1992**, *16* (1), 43-48.
94. Rosignoli, P.; Fabiani, R.; De, B. A.; Spinozzi, F.; Agea, E.; Pelli, M. A.; Morozzi, G. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* **2001**, *22* (10), 1675-1680.
95. Sengupta, S.; Muir, J. G.; Gibson, P. R. Does butyrate protect from colorectal cancer? *J Gastroenterol. Hepatol.* **2006**, *21* (1 Pt 2), 209-218.
96. Scharlau, D.; Borowicki, A.; Habermann, N.; Hofmann, T.; Klenow, S.; Miene, C.; Munjal, U.; Stein, K.; Glei, M. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat. Res* **2009**, *682* (1), 39-53.
97. Hassig, C. A.; Tong, J. K.; Schreiber, S. L. Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer. *Chem. Biol.* **1997**, *4* (11), 783-789.
98. Abrahamse, S. L.; Pool-Zobel, B. L.; Rechkemmer, G. Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis* **1999**, *20* (4), 629-634.
99. Gibson, P. R.; Rosella, O.; Wilson, A. J.; Mariadason, J. M.; Rickard, K.; Byron, K.; Bar-klá, D. H. Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effects of butyrate. *Carcinogenesis* **1999**, *20* (4), 539-544.

100. Ebert, M. N.; Beyer-Sehlmeyer, G.; Liegibel, U. M.; Kautenburger, T.; Becker, T. W.; Pool-Zobel, B. L. Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal. *Nutr. Cancer* **2001**, *41* (1-2), 156-164.
101. van, M., I; Nagengast, F. M. The role of carbohydrate fermentation in colon cancer prevention. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl* **1993**, *200*, 80-86.
102. McGarr, S. E.; Ridlon, J. M.; Hylemon, P. B. Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *J Clin. Gastroenterol.* **2005**, *39* (2), 98-109.
103. Borowicki, A.; Stein, K.; Scharlau, D.; Scheu, K.; Brenner-Weiss, G.; Obst, U.; Hollmann, J.; Lindhauer, M.; Wachter, N.; Glei, M. Fermented wheat aleurone inhibits growth and induces apoptosis in human HT29 colon adenocarcinoma cells. *Br. J Nutr.* **2010**, *103* (3), 360-369.
104. Nagengast, F. M.; Grubben, M. J.; van, M., I Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *Eur. J Cancer* **1995**, *31A* (7-8), 1067-1070.
105. Rosignoli, P.; Fabiani, R.; De, B. A.; Fuccelli, R.; Pelli, M. A.; Morozzi, G. Genotoxic effect of bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate. *Eur. J Nutr.* **2008**, *47* (6), 301-309.
106. Bosscher, D.; Breynaert, A.; Pieters, L.; Hermans, N. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *J Physiol Pharmacol.* **2009**, *60 Suppl* 6, 5-11.
107. Gibson, G. R.; Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* **1995**, *125* (6), 1401-1412.
108. Gibson, G. R.; Probert, H. M.; Loo, J. V.; Rastall, R. A.; Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res Rev.* **2004**, *17* (2), 259-275.
109. Bouhnik, Y.; Achour, L.; Paineau, D.; Riottot, M.; Attar, A.; Bornet, F. Four-week short chain fructo-oligosaccharides ingestion leads to increasing fecal bifidobacteria and cholesterol excretion in healthy elderly volunteers. *Nutr. J* **2007**, *6*, 42.
110. Pool-Zobel, B. L.; Sauer, J. Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans. *J. Nutr.* **2007**, *137* (11 Suppl), 2580S-2584S.
111. Hamer, H. M.; Jonkers, D.; Venema, K.; Vanhoutvin, S.; Troost, F. J.; Brummer, R. J. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2008**, *27* (2), 104-119.
112. Femia, A. P.; Luceri, C.; Dolara, P.; Giannini, A.; Biggeri, A.; Salvadori, M.; Clune, Y.; Collins, K. J.; Paglierani, M.; Caderni, G. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* **2002**, *23* (11), 1953-1960.
113. Verghese, M.; Rao, D. R.; Chawan, C. B.; Williams, L. L.; Shackelford, L. Dietary inulin suppresses azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colon tumors at the promotion stage in young Fisher 344 rats. *J Nutr.* **2002**, *132* (9), 2809-2813.

114. Rowland, I. R.; Rumney, C. J.; Coutts, J. T.; Lievense, L. C. Effect of Bifidobacterium longum and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* **1998**, *19* (2), 281-285.
115. Pool-Zobel, B.; van, L. J.; Rowland, I.; Roberfroid, M. B. Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *Br. J. Nutr.* **2002**, *87 Suppl 2*, S273-S281.
116. Reddy, B. S. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *J Nutr.* **1999**, *129* (7 Suppl), 1478S-1482S.
117. Wang, X.; Gibson, G. R. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl. Bacteriol.* **1993**, *75* (4), 373-380.
118. Gibson, G. R.; Beatty, E. R.; Wang, X.; Cummings, J. H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* **1995**, *108* (4), 975-982.
119. Gibson, G. R. Prebiotics as gut microflora management tools. *J Clin. Gastroenterol.* **2008**, *42 Suppl 2*, S75-S79.
120. Schrezenmeir, J.; de, V. M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am. J Clin. Nutr.* **2001**, *73* (2 Suppl), 361S-364S.
121. Fotiadis, C. I.; Stoidis, C. N.; Spyropoulos, B. G.; Zografos, E. D. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* **2008**, *14* (42), 6453-6457.
122. Vanderpool, C.; Yan, F.; Polk, D. B. Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel. Dis.* **2008**, *14* (11), 1585-1596.
123. Bischoff, S. C.; Manns, M. P. Probiotika, Präbiotika und Synbiotika - Stellenwert in Klinik und Praxis. *Deutsches Ärzteblatt*, **Mar 18, 2005**.
124. Round, J. L.; Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9* (5), 313-323.
125. Rafter, J. Probiotics and colon cancer. *Best. Pract. Res Clin. Gastroenterol.* **2003**, *17* (5), 849-859.
126. de, V. M.; Schrezenmeir, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* **2008**, *111*, 1-66.
127. Azcàrate-Peril, M. A.; Sikes, M.; Bruno-Barcena, J. M. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **2011**, *301* (3), G401-G424.
128. Pool-Zobel, B. L.; Neudecker, C.; Domizlaff, I.; Ji, S.; Schillinger, U.; Rumney, C.; Moretti, M.; Vilarini, I.; Scassellati-Sforzolini, R.; Rowland, I. Lactobacillus- and bifidobacterium-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr. Cancer* **1996**, *26* (3), 365-380.

129. Klinder, A.; Forster, A.; Caderni, G.; Femia, A. P.; Pool-Zobel, B. L. Fecal water genotoxicity is predictive of tumor-preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*), and their synbiotic combination. *Nutr. Cancer* **2004**, *49* (2), 144-155.
130. Ng, S. C.; Hart, A. L.; Kamm, M. A.; Stagg, A. J.; Knight, S. C. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm. Bowel. Dis.* **2009**, *15* (2), 300-310.
131. Tuohy, K. M.; Probert, H. M.; Smejkal, C. W.; Gibson, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (15), 692-700.
132. Worthley, D. L.; Le Leu, R. K.; Whitehall, V. L.; Conlon, M.; Christophersen, C.; Belobrajdic, D.; Mallitt, K. A.; Hu, Y.; Irahara, N.; Ogino, S.; Leggett, B. A.; Young, G. P. A human, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of prebiotic, probiotic, and synbiotic supplementation: effects on luminal, inflammatory, epigenetic, and epithelial biomarkers of colorectal cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *90* (3), 578-586.
133. Saulnier, D. M.; Gibson, G. R.; Kolida, S. In vitro effects of selected synbiotics on the human faecal microbiota composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2008**, *66* (3), 516-527.
134. Liong, M. T. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and in-vivo evidence. *Int J Mol. Sci.* **2008**, *9* (5), 854-863.
135. Le Leu, R. K.; Hu, Y.; Brown, I. L.; Woodman, R. J.; Young, G. P. Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis* **2010**, *31* (2), 246-251.
136. Rafter, J.; Bennett, M.; Caderni, G.; Clune, Y.; Hughes, R.; Karlsson, P. C.; Klinder, A.; O'Riordan, M.; O'Sullivan, G. C.; Pool-Zobel, B.; Rechkemmer, G.; Roller, M.; Rowland, I.; Salvadori, M.; Thijs, H.; van, L. J.; Watzl, B.; Collins, J. K. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85* (2), 488-496.
137. Quraishi, U. M.; Murat, F.; Abrouk, M.; Pont, C.; Confolent, C.; Oury, F. X.; Ward, J.; Boros, D.; Gebruers, K.; Delcour, J. A.; Courtin, C. M.; Bedo, Z.; Saulnier, L.; Guillon, F.; Balzergue, S.; Shewry, P. R.; Feuillet, C.; Charmet, G.; Salse, J. Combined meta-genomics analyses unravel candidate genes for the grain dietary fiber content in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Funct. Integr. Genomics* **2010**.
138. Slavin, J. Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.* **2003**, *62* (1), 129-134.
139. Kris-Etherton, P. M.; Hecker, K. D.; Bonanome, A.; Coval, S. M.; Binkoski, A. E.; Hilpert, K. F.; Griel, A. E.; Etherton, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* **2002**, *113 Suppl 9B*, 71S-88S.
140. Buri, R. C.; von Reding, W.; Gavin, M. H. Description and characterization of wheat aleurone. *Cereal Foods World* **2004**, *49*, 274-281.
141. Amrein, T. M.; Gränicner, P.; Arrigoni, E.; Amadò, R. In vitro digestibility and colonic fermentability of aleurone isolated from wheat bran. *Lebensm. -Wiss. u. Technol.* **2003**, *36*, 451-460.

142. Rhodes, D. I.; Sadek, M.; Stone, B. A. Hydroxycinnamic Acids in Walls of Wheat Aleurone Cells. *Journal of Cereal Science* **2002**, *36*, 67-81.
143. Shewry, P. R.; Piironen, V.; Lampi, A. M.; Edelman, M.; Kariluoto, S.; Nurmi, T.; Fernandez-Orozco, R.; Ravel, C.; Charmet, G.; Andersson, A. A.; Aman, P.; Boros, D.; Gebruers, K.; Dornez, E.; Courtin, C. M.; Delcour, J. A.; Rakszegi, M.; Bedo, Z.; Ward, J. L. The HEALTHGRAIN Wheat Diversity Screen: Effects of Genotype and Environment on Phytochemicals and Dietary Fiber Components (dagger). *J Agric. Food Chem.* **2010**.
144. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79* (5), 727-747.
145. Klepacka, J.; Fornal, L. Ferulic acid and its position among the phenolic compounds of wheat. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* **2006**, *46* (8), 639-647.
146. Kroon, P. A.; Williamson, G. Release of ferulic acid from sugar-beet pulp by using arabinanase, arabinofuranosidase and an esterase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1996**, *23* ( Pt 3), 263-267.
147. Slavin, J. L.; Jacobs, D.; Marquart, L. Grain processing and nutrition. *Crit Rev. Biotechnol.* **2001**, *21* (1), 49-66.
148. Bohm, A.; Bogoni, C.; Behrens, R.; Otto, T. Method for the extraction of aleurone from bran. (*Wo 02/15711 A2*) **2002**.
149. McIntosh, G. H.; Royle, P. J.; Pointing, G. Wheat aleurone flour increases cecal beta-glucuronidase activity and butyrate concentration and reduces colon adenoma burden in azoxymethane-treated rats. *J Nutr.* **2001**, *131* (1), 127-131.
150. Jenab, M.; Thompson, L. U. The influence of flaxseed and lignans on colon carcinogenesis and beta-glucuronidase activity. *Carcinogenesis* **1996**, *17* (6), 1343-1348.
151. Lupton, J. R.; Turner, N. D. Potential protective mechanisms of wheat bran fiber. *Am. J Med.* **1999**, *106* (1A), 24S-27S.
152. Ferguson, L. R.; Harris, P. J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *Eur. J Cancer Prev* **1999**, *8* (1), 17-25.
153. Ferguson, L. R.; Harris, P. J. Studies on the role of specific dietary fibres in protection against colorectal cancer. *Mutat. Res* **1996**, *350* (1), 173-184.
154. Alabaster, O.; Tang, Z.; Shivapurkar, N. Dietary fiber and the chemopreventive modelation of colon carcinogenesis. *Mutat. Res* **1996**, *350* (1), 185-197.
155. Femia, A. P.; Salvadori, M.; Broekaert, W. F.; Francois, I. E.; Delcour, J. A.; Courtin, C. M.; Caderni, G. Arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) reduce preneoplastic lesions in the colon of rats treated with 1,2-dimethylhydrazine (DMH). *Eur. J Nutr.* **2010**, *49* (2), 127-132.
156. MacLennan, R.; Macrae, F.; Bain, C.; Battistutta, D.; Chapuis, P.; Gratten, H.; Lambert, J.; Newland, R. C.; Ngu, M.; Russell, A.; Ward, M.; Wahlqvist, M. L. Randomized trial of intake of fat, fiber, and beta carotene to prevent colorectal adenomas. *J Natl. Cancer Inst.* **1995**, *87* (23), 1760-1766.

157. Reddy, B. S. Role of dietary fiber in colon cancer: an overview. *Am. J Med.* **1999**, *106* (1A), 16S-19S.
158. Muir, J. G.; Yeow, E. G.; Keogh, J.; Pizzey, C.; Bird, A. R.; Sharpe, K.; O'Dea, K.; Macrae, F. A. Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone. *Am. J Clin. Nutr.* **2004**, *79* (6), 1020-1028.
159. Hofmann, T.; Weber, A.; Sauer, J.; Glei, M.; Pool-Zobel, B. Formation of Tumour Promoting and Tumour Inhibitory Products during Gut Flora Mediated Fermentation of Inulin-Type Fructans and Wheat Bran. *accepted in Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **2008**.
160. Glei, M.; Hofmann, T.; Kuster, K.; Hollmann, J.; Lindhauer, M. G.; Pool-Zobel, B. L. Both wheat (*Triticum aestivum*) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect human colon cells from genotoxic activities of 4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (6), 2088-2095.
161. Kawabata, K.; Yamamoto, T.; Hara, A.; Shimizu, M.; Yamada, Y.; Matsunaga, K.; Tanaka, T.; Mori, H. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Lett.* **2000**, *157* (1), 15-21.
162. Hughes, S. A.; Shewry, P. R.; Li, L.; Gibson, G. R.; Sanz, M. L.; Rastall, R. A. In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans. *J Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (11), 4589-4595.
163. Pastell, H.; Westermann, P.; Meyer, A. S.; Tuomainen, P.; Tenkanen, M. In vitro fermentation of arabinoxylan-derived carbohydrates by bifidobacteria and mixed fecal microbiota. *J Agric. Food Chem* **2009**, *57* (18), 8598-8606.
164. Napolitano, A.; Costabile, A.; Martin-Pelaez, S.; Vitaglione, P.; Klinder, A.; Gibson, G. R.; Fogliano, V. Potential prebiotic activity of oligosaccharides obtained by enzymatic conversion of durum wheat insoluble dietary fibre into soluble dietary fibre. *Nutr. Metab Cardiovasc. Dis.* **2009**, *19* (4), 283-290.
165. Van, C. V.; Swennen, K.; Dornez, E.; Van de, W. T.; Marzorati, M.; Verstraete, W.; Delaedt, Y.; Onagbesan, O.; Decuypere, E.; Buyse, J.; De, K. B.; Broekaert, W. F.; Delcour, J. A.; Courtin, C. M. Structurally different wheat-derived arabinoxyloligosaccharides have different prebiotic and fermentation properties in rats. *J Nutr.* **2008**, *138* (12), 2348-2355.
166. Neyrinck, A. M.; De, B. F.; Cani, P. D.; Bindels, L. B.; Stroobants, A.; Portetelle, D.; Delzenne, N. M. Immunomodulatory properties of two wheat bran fractions - aleurone-enriched and crude fractions - in obese mice fed a high fat diet. *Int. Immunopharmacol.* **2008**, *8* (10), 1423-1432.
167. Costabile, A.; Klinder, A.; Fava, F.; Napolitano, A.; Fogliano, V.; Leonard, C.; Gibson, G. R.; Tuohy, K. M. Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Br. J Nutr.* **2008**, *99* (1), 110-120.
168. Macfarlane, G. T.; Gibson, G. R.; Cummings, J. H. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* **1992**, *72* (1), 57-64.
169. Knudsen, K. E. B.; Hesso, I. Recovery of Inulin from Jerusalem-Artichoke (*Helianthus-Tuberosus* L) in the Small Intestine of Man. *Br J Nutr* **1995**, *74*, 101-113.



170. Scharlau, D.; Borowicki, A.; Stein, K.; Glej, M. Use of *in vitro* digestions and fermentation models to study health effects of dietary fibres in cultured cells. In *Dietary Fibre, Fruit and Vegetable Consumption and Health*, Klein, F.; Möller, G., Eds.; Nova Science Publisher, Inc.: 2010; pp 157-172.
171. Barry, J. L.; Hoebler, C.; Macfarlane, G. T.; Macfarlane, S.; Mathers, J. C.; Reed, K. A.; Mortensen, P. B.; Nordgaard, I.; Rowland, I. R.; Rumney, C. J. Estimation of the fermentability of dietary fibre in vitro: a European interlaboratory study. *Br. J. Nutr.* **1995**, *74* (3), 303-322.
172. Minekus, M.; Marteau, P.; Havenaar, R.; Huisintveld, J. H. J. A Multicompartmental Dynamic Computer-Controlled Model Simulating the Stomach and Small-Intestine. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **1995**, *23*, 197-209.
173. Gibson, G. R.; Cummings, J. H.; Macfarlane, G. T. Use of A 3-Stage Continuous Culture System to Study the Effect of Mucin on Dissimilatory Sulfate Reduction and Methanogenesis by Mixed Populations of Human Gut Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **1988**, *54*, 2750-2755.
174. Macfarlane, G. T.; Cummings, J. H.; Macfarlane, S.; Gibson, G. R. Influence of retention time on degradation of pancreatic enzymes by human colonic bacteria grown in a 3-stage continuous culture system. *J. Appl. Bacteriol.* **1989**, *67* (5), 520-527.
175. Minekus, M.; Smeets-Peeters, M.; Bernalier, A.; Marol-Bonnin, S.; Havenaar, R.; Marteau, P.; Alric, M.; Fonty, G.; Huis, i., V A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *53* (1), 108-114.
176. Molly, K.; Vande, W. M.; Verstraete, W. Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1993**, *39* (2), 254-258.
177. Lebet, V.; Arrigoni, E.; Amadò, R. Digestion procedure using mammalian enzymes to obtain substrates for in vitro fermentation studies. *Lebenssm. -Wiss. u. Technol.* **1998**, *31*, 509-515.
178. Fassler, C.; Gill, C. I.; Arrigoni, E.; Rowland, I.; Amado, R. Fermentation of resistant starches: influence of in vitro models on colon carcinogenesis. *Nutr. Cancer* **2007**, *58* (1), 85-92.
179. Aura, A. M.; Härkönen, H.; Fabritius, M.; Poutanen, K. Development of an in vitro enzymatic digestion method for removal of starch and protein and assessment of its performance using rye and wheat breads. *Journal of Cereal Science* **1999**, *29*, 139-152.
180. Wang, J. F.; Zhu, Y. H.; Li, D. F.; Wang, Z.; Jensen, B. B. In vitro fermentation of various fiber and starch sources by pig fecal inocula. *J. Anim Sci.* **2004**, *82* (9), 2615-2622.
181. Burkard, I.; von, E. A.; Rentsch, K. M. Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *826* (1-2), 147-159.
182. Chaney, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin Chem* **1962**, *8*, 130-132.

183. He, G. Q.; Kong, Q.; Chen, Q. H.; Ruan, H. Batch and fed-batch production of butyric acid by clostridium butyricum ZJUCB. *J Zhejiang. Univ Sci. B* **2005**, *6* (11), 1076-1080.
184. Timmerman, H. M.; Koning, C. J.; Mulder, L.; Rombouts, F. M.; Beynen, A. C. Monostrain, multistain and multispecies probiotics--A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol.* **2004**, *96* (3), 219-233.
185. Macfarlane, G. T.; Macfarlane, S. Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18* (2), 156-162.
186. Munjal, U.; Gleib, M.; Pool-Zobel, B. L.; Scharlau, D. Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. *Br. J Nutr.* **2009**, 1-9.
187. Beyer-Sehlmeyer, G.; Gleib, M.; Hartmann, E.; Hughes, R.; Persin, C.; Bohm, V.; Rowland, I.; Schubert, R.; Jahreis, G.; Pool-Zobel, B. L. Butyrate is only one of several growth inhibitors produced during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre sources. *Br. J. Nutr.* **2003**, *90* (6), 1057-1070.
188. Burghardt, W. Erkrankungen der Gallenblase und Gallengänge. In *Ernährungsmedizin*, 4 ed.; Biesalski, H. K.; Bischoff, S. C.; Puchstein, C., Eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2010; p 679.
189. Shiraki, K.; Ito, T.; Sugimoto, K.; Fuke, H.; Inoue, T.; Miyashita, K.; Yamanaka, T.; Suzuki, M.; Nabeshima, K.; Nakano, T.; Takase, K. Different effects of bile acids, ursodeoxycholic acid and deoxycholic acid, on cell growth and cell death in human colonic adenocarcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.* **2005**, *16* (4), 729-733.
190. Bhagavan, N. V. Gastrointestinal Digestion and Absorption. In *Medical Biochemistry*, fourth ed. S Harcourt Science and Technology Company, Academic Press, Canada ed.; 2002; pp 216-217.
191. Topping, D. L.; Clifton, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* **2001**, *81* (3), 1031-1064.
192. McIntosh, G. H.; Le Leu, R. K. The influence of dietary proteins on colon cancer risk. *Nutr. Res* **2001**, *21* (7), 1053-1066.
193. Zampa, A.; Silvi, S.; Fabiani, R.; Morozzi, G.; Orpianesi, C.; Cresci, A. Effects of different digestible carbohydrates on bile acid metabolism and SCFA production by human gut micro-flora grown in an in vitro semi-continuous culture. *Anaerobe.* **2004**, *10* (1), 19-26.
194. Ridlon, J. M.; Kang, D. J.; Hylemon, P. B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* **2006**, *47* (2), 241-259.
195. Geier, M. S.; Butler, R. N.; Howarth, G. S. Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biol. Ther.* **2006**, *5* (10), 1265-1269.
196. Das, D.; Arber, N.; Jankowski, J. A. Chemoprevention of colorectal cancer. *Digestion* **2007**, *76* (1), 51-67.

197. Birkett, A.; Muir, J.; Phillips, J.; Jones, G.; O'Dea, K. Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans. *Am. J Clin. Nutr.* **1996**, *63* (5), 766-772.
198. Lupton, J. R.; Marchant, L. J. Independent effects of fiber and protein on colonic luminal ammonia concentration. *J Nutr.* **1989**, *119* (2), 235-241.
199. Vince, A. J.; McNeil, N. I.; Wager, J. D.; Wrong, O. M. The effect of lactulose, pectin, arabinogalactan and cellulose on the production of organic acids and metabolism of ammonia by intestinal bacteria in a faecal incubation system. *Br. J Nutr.* **1990**, *63* (1), 17-26.
200. Mortensen, P. B. The effect of oral-administered lactulose on colonic nitrogen metabolism and excretion. *Hepatology* **1992**, *16* (6), 1350-1356.
201. Biesalski, H. K.; Fürst, P.; Kasper, H.; Kluthe, R.; Pöler, W.; Puchstein, C.; Stähelin, H. B. *Ernährungsmedizin: nach dem Curriculum Ernährungsmedizin der Bundesärztekammer*; 3 ed.; 2004.
202. Cummings, J. H.; Englyst, H. N. Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am. J Clin. Nutr.* **1987**, *45* (5 Suppl), 1243-1255.
203. Borowicki, A.; Michelmann, A.; Stein, K.; Scharlau, D.; Scheu, K.; Obst, U.; Gleis, M. Fermented wheat aleurone enriched with probiotic strains LGG and Bb12 modulates markers of tumor progression in human colon cells. *Nutr. Cancer* **2011**, *63* (1), 151-160.
204. Vardakou, M.; Palop, C. N.; Christakopoulos, P.; Faulds, C. B.; Gasson, M. A.; Narbad, A. Evaluation of the prebiotic properties of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity in gut microflora. *Int J Food Microbiol.* **2008**, *123* (1-2), 166-170.
205. Blaut, M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur. J. Nutr.* **2002**, *41 Suppl 1*, I11-I16.
206. Duncan, S. H.; Louis, P.; Flint, H. J. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70* (10), 5810-5817.
207. Pigeon, R. M.; Cuesta, E. P.; Gililliand, S. E. Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria. *J Dairy Sci.* **2002**, *85* (11), 2705-2710.
208. Sakata, T.; Kojima, T.; Fujieda, M.; Miyakozawa, M.; Takahashi, M.; Ushida, K. Probiotic preparations dose-dependently increase net production rates of organic acids and decrease that of ammonia by pig cecal bacteria in batch culture. *Dig. Dis. Sci.* **1999**, *44* (7), 1485-1493.
209. Visek, W. J. Diet and cell growth modulation by ammonia. *Am. J Clin. Nutr.* **1978**, *31* (10 Suppl), S216-S220.
210. Veeriah, S.; Miene, C.; Habermann, N.; Hofmann, T.; Klenow, S.; Sauer, J.; Bohmer, F.; Wölfl, S.; Pool-Zobel, B. L. Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells. *Int J Cancer* **2008**, *122* (12), 2647-2655.

211. Sauer, J.; Richter, K. K.; Pool-Zobel, B. L. Products formed during fermentation of the prebiotic inulin with human gut flora enhance expression of biotransformation genes in human primary colon cells. *Br. J Nutr.* **2007**, *97* (5), 928-937.
212. Bellion, P.; Hofmann, T.; Pool-Zobel, B. L.; Will, F.; Dietrich, H.; Knaup, B.; Richling, E.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Janzowski, C. Antioxidant effectiveness of phenolic apple juice extracts and their gut fermentation products in the human colon carcinoma cell line caco-2. *J Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (15), 6310-6317.
213. Kwak, M. K.; Wakabayashi, N.; Kensler, T. W. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat. Res* **2004**, *555* (1-2), 133-148.
214. Kaspar, J. W.; Niture, S. K.; Jaiswal, A. K. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47* (9), 1304-1309.
215. Harvey, C. J.; Thimmulappa, R. K.; Singh, A.; Blake, D. J.; Ling, G.; Wakabayashi, N.; Fujii, J.; Myers, A.; Biswal, S. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46* (4), 443-453.
216. Hur, W.; Gray, N. S. Small molecule modulators of antioxidant response pathway. *Curr. Opin. Chem Biol.* **2011**, *15* (1), 162-173.
217. Giudice, A.; Montella, M. Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention. *Bioessays* **2006**, *28* (2), 169-181.
218. Kautenburger, T.; Beyer-Sehlmeyer, G.; Festag, G.; Haag, N.; Kuhler, S.; Kuchler, A.; Weise, A.; Marian, B.; Peters, W. H.; Liehr, T.; Claussen, U.; Pool-Zobel, B. L. The gut fermentation product butyrate, a chemopreventive agent, suppresses glutathione S-transferase theta (hGSTT1) and cell growth more in human colon adenoma (LT97) than tumor (HT29) cells. *J Cancer Res Clin. Oncol.* **2005**, *131* (10), 692-700.
219. Gleit, M.; Kirmse, A.; Habermann, N.; Persin, C.; Pool-Zobel, B. L. Bread enriched with green coffee extract has chemoprotective and antigenotoxic activities in human cells. *Nutr. Cancer* **2006**, *56* (2), 182-192.
220. Kawai, K.; Viars, C.; Arden, K.; Tarin, D.; Urquidi, V.; Goodison, S. Comprehensive karyotyping of the HT-29 colon adenocarcinoma cell line. *Genes Chromosomes. Cancer* **2002**, *34* (1), 1-8.
221. Potten, C. S.; Loeffler, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **1990**, *110* (4), 1001-1020.
222. Uchida, K. Induction of glutathione S-transferase by prostaglandins. *Mech. Ageing Dev.* **2000**, *116* (2-3), 135-140.
223. Pool-Zobel, B. L.; Selvaraju, V.; Sauer, J.; Kautenburger, T.; Kiefer, J.; Richter, K. K.; Soom, M.; Wöfl, S. Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* **2005**, *26* (6), 1064-1076.

224. Ebert, M. N.; Klinder, A.; Peters, W. H.; Schaferhenrich, A.; Sendt, W.; Scheele, J.; Pool-Zobel, B. L. Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate. *Carcinogenesis* **2003**, *24* (10), 1637-1644.
225. Ramos, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr Food Res.* **2008**, *52* (5), 507-526.
226. Sauer, J.; Richter, K. K.; Pool-Zobel, B. L. Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J Nutr. Biochem.* **2007**, *18* (11), 736-745.
227. Yano, S.; Tierney, D. F. Butyrate increases catalase activity and protects rat pulmonary artery smooth muscle cells against hyperoxia. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **1989**, *164* (3), 1143-1148.
228. Clifford, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric* **2000**, *80*, 1033-1043.
229. Roberfroid, M. B. Introducing inulin-type fructans. *Br. J Nutr.* **2005**, *93 Suppl 1*, S13-S25.
230. Pool-Zobel, B. L.; Abrahamse, S. L.; Collins, A. R.; Kark, W.; Gugler, R.; Oberreuther, D.; Siegel, E. G.; Treptow-van, L. S.; Rechkemmer, G. Analysis of DNA strand breaks, oxidized bases, and glutathione S-transferase P1 in human colon cells from biopsies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1999**, *8* (7), 609-614.
231. Sandstrom, B. E.; Marklund, S. L. Effects of variation in glutathione peroxidase activity on DNA damage and cell survival in human cells exposed to hydrogen peroxide and t-butyl hydroperoxide. *Biochem. J* **1990**, *271* (1), 17-23.
232. Pool-Zobel, B.; Veeriah, S.; Bohmer, F. D. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens -- focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutat. Res* **2005**, *591* (1-2), 74-92.
233. Mueller, S.; Saunier, K.; Hanisch, C.; Norin, E.; Alm, L.; Midtvedt, T.; Cresci, A.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Verdenelli, M. C.; Clavel, T.; Koebnick, C.; Zunft, H. J.; Dore, J.; Blaut, M. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72* (2), 1027-1033.
234. Fitch, M. D.; Fleming, S. E. Metabolism of short-chain fatty acids by rat colonic mucosa in vivo. *Am. J Physiol* **1999**, *277* (1 Pt 1), G31-G40.
235. van, L. J.; Clune, Y.; Bennett, M.; Collins, J. K. The SYNCAN project: goals, set-up, first results and settings of the human intervention study. *Br. J Nutr.* **2005**, *93 Suppl 1*, S91-S98.
236. Hayes, J. D.; McLellan, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res* **1999**, *31* (4), 273-300.
237. Wollowski, I.; Ji, S. T.; Bakalinsky, A. T.; Neudecker, C.; Pool-Zobel, B. L. Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats. *J Nutr.* **1999**, *129* (1), 77-82.

238. Kikuzaki, H.; Hisamoto, M.; Hirose, K.; Akiyama, K.; Taniguchi, H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (7), 2161-2168.
239. Di, D. F.; Perluigi, M.; Foppoli, C.; Blarzino, C.; Coccia, R.; De, M. F.; Butterfield, D. A.; Cini, C. Protective effect of ferulic acid ethyl ester against oxidative stress mediated by UVB irradiation in human epidermal melanocytes. *Free Radic. Res* **2009**, *43* (4), 365-375.
240. Mai, V.; Draganov, P. V. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World J Gastroenterol.* **2009**, *15* (1), 81-85.
241. Flint, H. J.; Bayer, E. A.; Rincon, M. T.; Lamed, R.; White, B. A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6* (2), 121-131.
242. Crittenden, R.; Karppinen, S.; Ojanen, S.; Tenkanen, M.; Fagerström, R.; Mättö, J.; Saarela, M.; Mattila-Sandholm, T.; Poutanen, K. *In vitro* fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *J Sci Food Agric* **2002**, *82*, 781-789.
243. Bingham, S. A. Mechanisms and experimental and epidemiological evidence relating dietary fibre (non-starch polysaccharides) and starch to protection against large bowel cancer. *Proc. Nutr. Soc.* **1990**, *49* (2), 153-171.
244. Belenguer, A.; Duncan, S. H.; Calder, A. G.; Holtrop, G.; Louis, P.; Lobley, G. E.; Flint, H. J. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72* (5), 3593-3599.
245. Walker, A. W.; Duncan, S. H.; William Leitch, E. C.; Child, M. W.; Flint, H. J. pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (7), 3692-3700.
246. Franz, C. M.; Holzapfel, W. H.; Stiles, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J Food Microbiol.* **1999**, *47* (1-2), 1-24.
247. Huycke, M. M.; Moore, D. R. In vivo production of hydroxyl radical by *Enterococcus faecalis* colonizing the intestinal tract using aromatic hydroxylation. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33* (6), 818-826.
248. Joint FAO-WHO (Food and Health Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization) Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food) *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*; Working Group on Drafting Guideline for the Evaluation of Probiotics in Food: London, Ontario, Canada, **2002**.
249. Collado, M. C.; Meriluoto, J.; Salminen, S. *In vitro* analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International* **2007**, *40*, 629-636.
250. Cloetens, L.; Broekaert, W. F.; Delaedt, Y.; Ollevier, F.; Courtin, C. M.; Delcour, J. A.; Rutgeerts, P.; Verbeke, K. Tolerance of arabinoxylan-oligosaccharides and their

- prebiotic activity in healthy subjects: a randomised, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr* **2010**, *103* (5), 703-713.
251. Belenguer, A.; Duncan, S. H.; Holtrop, G.; Anderson, S. E.; Lobley, G. E.; Flint, H. J. Impact of pH on lactate formation and utilization by human fecal microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (20), 6526-6533.
  252. Belenguer, A.; Holtrop, G.; Duncan, S. H.; Anderson, S. E.; Calder, A. G.; Flint, H. J.; Lobley, G. E. Rates of production and utilization of lactate by microbial communities from the human colon. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2011**, *77* (1), 107-119.
  253. Roberfroid, M.; Gibson, G. R.; Hoyles, L.; McCartney, A. L.; Rastall, R.; Rowland, I.; Wolvers, D.; Watzl, B.; Szajewska, H.; Stahl, B.; Guarner, F.; Respondek, F.; Whelan, K.; Coxam, V.; Davicco, M. J.; Leotoing, L.; Wittrant, Y.; Delzenne, N. M.; Cani, P. D.; Neyrinck, A. M.; Meheust, A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J Nutr.* **2010**, *104 Suppl 2*, S1-63.
  254. Marteau, P.; Pochart, P.; Flourie, B.; Pellier, P.; Santos, L.; Desjeux, J. F.; Rambaud, J. C. Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. *Am. J Clin. Nutr.* **1990**, *52* (4), 685-688.
  255. Burns, A. J.; Rowland, I. R. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2000**, *1* (1), 13-24.
  256. Andreasen, M. F.; Kroon, P. A.; Williamson, G.; Garcia-Conesa, M. T. Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31* (3), 304-314.
  257. Kroon, P. A.; Faulds, C. B.; Ryden, P.; Robertson, J. A.; Williamson, G. Release of Covalently Bound Ferulic Acid from Fiber in the Human Colon. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 661-667.
  258. Montesi, A.; Garcia-Albiach, R.; Pozuelo, M. J.; Pintado, C.; Goni, I.; Rotger, R. Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. *Int J Food Microbiol.* **2005**, *98* (3), 281-289.
  259. Heilig, H. G.; Zoetendal, E. G.; Vaughan, E. E.; Marteau, P.; Akkermans, A. D.; de Vos, W. M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68* (1), 114-123.
  260. Frahm, E.; Obst, U. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *J Microbiol. Methods* **2003**, *52* (1), 123-131.
  261. Muyzer, G.; de Waal, E. C.; Uitterlinden, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59* (3), 695-700.

## Anhang

Tab. 9 Primer und Detektionssysteme für die real-time qPCR

Bakteriengruppe	Primer	Sequenz 5' → 3'	Detektionssystem
<i>Bifidobacteria</i> (258)	Bif662r Bif164f	CCACCGTTACACCGGGAA GGGTGGTAATGCCGGATG	PowerSYBR® Green
<i>Lactobacilli</i> (259)	Lab159f Lab677r	GGAAACAGRTGCTAATACCG CACCGCTACACATGGAG	PowerSYBR® Green
<i>Enterokokken</i> (260)	ECST784F ENC854R GPL813TQ	AGAAATTCCAAACGAACTTG CAGTGCTCTACCTCCATCATT FAM-GGTTCTCTCCGAAATAG CTTTAGGGCTA-TAMRA	Primer/Probe (DNA-Sonde) TaqMan®
<i>Eubakterien</i> (261)	27f 517r	AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	PowerSYBR® Green

Tab. 10 Temperaturprofile für die real-time qPCR

		<i>Bifidobacteria</i>	<i>Lactobacilli</i>	<i>Enterokokken</i>	<i>Eubakterien</i>
<i>Initiale Denaturierung</i>	Temperatur [°C]			95	
	Zeit	15 min		10 min	15 min
<i>Denaturierung</i>	Temperatur [°C]			95	
	Zeit			15 s	
<i>Annealing</i>	Temperatur [°C]	55	53	60	58
	Zeit	45 s	30 s	1 min	45 s
<i>Elongation</i>	Temperatur [°C]	72		-	72
	Zeit	1 min		-	1 min



---

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

---

geboren am: 03.10.1981 in Jena

Familienstand: ledig

### Beruflicher Werdegang

---

seit 01/2010            wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Ernährungswissenschaften, Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, Jena

10/2009 – 12/2009    Weiterbildung zur Qualitätsmanagement-Beauftragte

### Hochschulausbildung

---

02/2007 – 09/2009    Promotionsstudentin am Institut für Ernährungswissenschaften, Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, FSU Jena unter Bearbeitung des Verbundprojektes „Triple plus functional food“ (BMBF, 0313829A) mit dem Thema:

*Molekulare Mechanismen protektiver Eigenschaften von Weizen-aleuron in humanen Kolonzellen*

10/2004 – 03/2005    Auslandsaufenthalt in Wien, Studium an der Universität Wien, Department der Ernährungswissenschaften

10/2000 – 09/2006    Friedrich-Schiller-Universität Jena, Studium der Ernährungswissenschaften mit Abschluss als Diplom-Ernährungswissenschaftlerin, Note 1,3  
Diplomarbeit am Fritz-Lipman-Institut Jena, Leibnitz Institut für Altersforschung, Abteilung Einzelzell- und Einzelmolekültechniken

---

Thema: „Modifikation des Wachstums der humanen Kolonadenokarzinomzelllinie HT29 durch 4-Hydroxy-2-nonenal und knock down des DNA Reparaturproteins 3-Methylpurin-DNA-Glykosylase durch RNA-Interferenz“

09/2003 – 10/2003    Institut für molekulare Ernährungsforschung, Abteilung Einzelzell- und Molekültechnik,  
*Praktikantin im Rahmen des Wahlpflichtfaches Molekulare Ernährungsforschung*  
Praktikumsprojekt: Vergleich von Methoden zur Quantifizierung des oxidativen DNA-Schadens 8-oxo-Guanin

### **Schule**

---

06/2000                    Abitur am Gymnasium „Johann Heinrich Pestalozzi“, Stadtroda

### **Wissenschaftliche Tätigkeiten**

---

#### ***Publikationen***

Borowicki A, Michelmann A, **Stein K**, Scharlau D, Scheu K, Obst U, Gleis M: Fermented wheat aleurone enriched with probiotic strains LGG and Bb12 modulates markers of tumor progression in human colon cells. *Nutr Cancer*. 2011;63(1):151-60.

Borowicki A, **Stein K**, Scharlau D, Scheu K, Brenner-Weiss G, Obst U, Hollmann J, Lindhauer M, Wachter N, Gleis M: Fermented wheat aleurone inhibits growth and induces apoptosis in human HT29 colon adenocarcinoma cells. *Br J Nutr*. 2010, 103(3):360-9.

Borowicki A, **Stein K**, Scharlau D, Gleis M: Fermentation supernatants of wheat (*Triticum aestivum* L.) aleurone beneficially modulate cancer progression in human colon cells. *J Agric Food Chem*. 2010, 58(3):2001-7.

Scharlau, D, Borowicki, A, Habermann, N, Hofmann, T, Klenow, S, Miene, C, Munjal, U, **Stein, K**, Gleis, M: Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other prod-

---

ucts formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat Res.* 2009 Jul-Aug;682(1):39-53.

### **Kurzbeitrag**

**Stein, K.**; Borowicki, A.; Scharlau, D. und Glei, M.: „Fermentiertes Weizenaleuron angereichert mit Probiotika (LGG®/Bb12) beeinflusst fremdstoffmetabolisierende Enzyme in humanen Kolonzellen“ *Proceedings of the German Nutrition Society, Abstractband zum 47. Wissenschaftlichen Kongress der DGE, Volume 14 (2010), S. 54*

### **Buchbeitrag**

Scharlau, D.; Borowicki, A.; **Stein, K.**; Glei, M. Use of *in vitro* digestions and fermentation models to study health effects of dietary fibres in cultured cells. In: *Dietary Fibre, Fruit and Vegetable Consumption and Health*, Klein, F.; Möller, G., Eds.; Nova Science Publisher, Inc.: 2010; pp 157-172.

### **Poster**

**Stein, K.**; Borowicki, A.; Scharlau, D. und Glei, M.: „Fermentiertes Weizenaleuron angereichert mit Probiotika (LGG®/Bb12) beeinflusst fremdstoffmetabolisierende Enzyme in humanen Kolonzellen“ 47. *Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V., Friedrich-Schiller-Universität Jena, 11.03.-12.03.2010, Jena*

**Stein, K.**; Borowicki A.; Scharlau, D.; Scheu, K.; Wachter, N.; Glei M.: “Fermentation Products of Wheat Aleurone Increase Activity of Catalase and Glutathion-S-Transferases in HT29 Cells” 4<sup>th</sup> *International Dietary Fibre Conference 2009, July 1-3 2009, Wien*

Borowicki, A.; Michelmann, A.; **Stein, K.**; Scharlau, D.; Scheu, K.; Wachter, N.; Glei, M.: “Chemopreventive Activity of Fermented Wheat Aleurone Enriched With Probiotics (LGG/Bb12)-Inhibition of Growth and Induction of Apoptosis in Colon Cancer Cells” 4<sup>th</sup> *International Dietary Fibre Conference 2009, July 1-3 2009, Wien*

---

**Stein, K.;** Borowicki, A.; Glei, M.; Scharlau, D.; Scheu, K.; Brenner-Weiss, G.; Pool-Zobel, B. L.: „Modification of an in vitro model simulating the whole digestive process to investigate cellular endpoints of carcinogenesis and chemoprevention” *Beneficial Microbes Conference, International Conference on the health impact and future potential of beneficial microbes 2008, May 29-30 2009, Amsterdam*

Borowicki, A.; **Stein, K.;** Scharlau, D.; Glei, M.; Scheu, K.; Brenner-Weiss, G.; Gusko, M.; Pool-Zobel, B. L.: „Gut fermentation products of wheat aleurone suppress cell growth and survival of human adenocarcinoma cells” *Beneficial Microbes Conference, International Conference on the health impact and future potential of beneficial microbes 2008, May 29-30 2009, Amsterdam*

Jena, den 24.05.2012

Katrin Stein

---

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei der viel zu früh verstorbenen Frau Prof. Beatrice Louise Pool-Zobel bedanken, die mich für dieses interessante Forschungsgebiet begeisterte und mir ermöglichte, dieses Thema im Rahmen einer Promotion zu bearbeiten.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Michael Glei für die erstklassige Betreuung danken. Er war stets für Diskussionen bereit und gab mir zahlreiche Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Außerdem gilt mein besonderer Dank Dr. Daniel Scharlau, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir bei vielen Problemen und Unklarheit freundschaftlich mit Rat und Tat zur Seite stand. Für die gute und konstruktive Zusammenarbeit als auch das freundliche Arbeitsklima innerhalb der Arbeitsgruppe der Etox bin ich sehr dankbar. Insbesondere danke ich Esther Woschee, meiner Diplomandin und meinen Praktikantinnen für ihre tatkräftige und ausdauernde Hilfe in zahlreichen Experimenten. Darüber hinaus danke ich Claudia Miene für ihre hilfreiche Unterstützung und ihre enorme Geduld mit mir.

Bedanken möchte ich mich vor allem bei Anke Borowicki, die mich während unserer gemeinsamen Promotionszeit hervorragend unterstützt und sehr motiviert hat. Sie hat mir beruflich als auch freundschaftlich immer den Rücken gestärkt, wodurch sie zum Erfolg dieser Arbeit wesentlich beigetragen hat.

Für die finanzielle Unterstützung des Projektes danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF 0313829A). Damit verbunden ist der Dank an alle Projektpartner (Kampffmeyer Food Innovation GmbH, des Max-Rubner Instituts Detmold und des Forschungszentrums Karlsruhe, besonders Kerstin Scheu und Anke Neidig), für die erfolgreiche Zusammenarbeit. Herrn Walter von Reding (Bühler AG, Schweiz) und Frau Dr. Anne Franck (Orafti, Belgien) möchte ich meinen Dank aussprechen, da sie die Testsubstanzen zur Verfügung stellten.

Für die Anstrengungen beim Korrekturlesen, welche Liliane Holland-Reichert und mein Bruder Enrico Stein kurzfristig auf sich genommen haben, bin ich ihnen dankbar.

Meinem Freund Steve Beythien danke ich von Herzen für seine große Geduld in zeitweise nervenzehrenden Momenten, seine aufmunternden Worte und seinen Glauben an mich.

Zuletzt gilt besonderen Dank meiner Familie für die lückenlose Unterstützung während meines gesamten Lebensweges. Ohne ihren tatkräftigen und moralischen Beistand und vor allem Liebe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

---

## **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die Arbeit wurde in keiner Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Jena, den 24.05.2012

Katrin Stein

---

## Ehrenwörtliche Erklärung

Mit diesem Schreiben als Anlage zu meiner Dissertation mit dem Titel „Primärpräventive Effekte von Weizenaleuron in humanen Kolonzellen“ erkläre ich, dass...

- mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist.
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe (Selbständigkeitserklärung), keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen wurden und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind.
- alle Personen angegeben wurden, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben.
- ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe und Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfungen eingereicht habe.
- ich die gleiche bzw. eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation noch nicht eingereicht habe.

Jena, den 24.05.2012

Katrin Stein